

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**INDEPENDENCIA DE LOS FACTORES DE
LA INICIACIÓN EN LA TRADUCCIÓN DE
LOS mRNAs VIRALES**

TESIS DOCTORAL

Ewelina Wełnowska-Zgid

Madrid, 2012

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”**, bajo la dirección del Dr. Luis Carrasco Llamas, con la financiación de una beca FPI y del proyecto BMC2003-00494 otorgado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Dla moich rodziców
i męża

AGRADECIMEINTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Luis por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo, por su dirección y consejo y sobre todo por su paciencia.

Esta tesis no la podría haber realizado sin el apoyo de los compañeros que estuvieron en el laboratorio. Entre ellos, quiero agradecer a Alfredo, mi codirector pero tambien amigo, que tuvo que aguantar bastante conmigo. A Susana, que era la primera en hablarme, al principio en ingles. A Vanesita, por su sonrisa y la compania en Retiro con los patines. A Miguel Ángel, por su ayuda en cada situacion. Y tambien a Kike, por su sentido de humor...

Również chciałam podziękować moim przyjaciółkom. Anetko, gwiazdo, dzięki Tobie przetrwałam wiele ciężkich chwil. Dobrze, że mój dom stał na Twojej drodze do domu :-). Karolinko, siostrzeczko moja z wyboru, kiedy tylko już nie dawałam rady, Ty wsiadałaś w samolot i byłaś u mnie. Dziękuję Ci, że zawsze mogłam na Ciebie liczyć.

Oczywiście chciałam podziękować mojej rodzinie. Przede wszystkim moim rodzicom bez których moja przygoda z Madrytem nie mogłaby mieć miejsca. Oni mnie wspierali w najtrudniejszych dla mnie momentach i to dzięki nim jestem tym kim jestem. Dziękuję mojemu mężowi, który zawsze we mnie wierzył i dodawał mi otuchy. Podtrzymywał mnie na duchu, pomimo tego, że nie zawsze było łatwo. Kocham was

Indice

ABREVIATURAS	3
SUMMARY	4
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS	10
1.1.1 MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	10
1.1.1.1 Mecanismo dependiente del <i>cap</i>	10
1.1.1.2 Mecanismo de iniciación independiente del <i>cap</i>	13
1.1.2 FACTORES DE LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	13
1.1.2.1 El factor eIF4G	13
1.1.2.2 El factor eIF4A	15
1.1.2.3 El factor eIF4E	16
1.1.2.4 El factor eIF2	17
1.2 REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN CÉLULAS INFECTADAS POR VIRUS	19
1.2.1 LOS PICORNAVIRUS: EL VIRUS DE LA ENCEFALOMIOCARDITIS	20
1.2.2 CORTE DE EIF4G EN LAS CÉLULAS INFECTADAS POR POR PICORNAVIRUS	21
1.2.3 FOSFORILACIÓN DEL EIF2 EN CÉLULAS INFECTADAS POR ALPHAVIRUS Y POR PICORNAVIRUS	23
1.2.4 CÉLULAS INFECTADAS POR EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR – VSV	25
1.2.5 CÉLULAS INFECTADAS POR EL VIRUS DE LA GRIPE	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVOS	32
3 MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 MANIPULACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO Y VIRUS	36
3.1.1 LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO	36
3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE MAMÍFERO.	36
3.1.3 ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS CON MRNAs SINTETIZADOS <i>IN VITRO</i> .	36
3.1.4 TRANSFECCIÓN DE siRNAs	37
3.1.5 MARCAJE METABÓLICO DE PROTEÍNAS	37
3.1.6 MICROSCOPIA CONFOCAL	37
3.1.7 VIRUS	38
3.2 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
3.2.1 SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE DNA Y RNA EN GELES DE AGAROSA	39
3.2.2 PLÁSMIDOS	39
3.2.3 EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR A TIEMPO REAL	40
3.2.4 siRNAs	41
3.2.5 TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i>	41
3.3 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	42
3.3.1 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	42
3.3.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	42
3.3.3 FLUOROGRAFÍA Y AUTORADIOGRAFÍA	42
3.3.4 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	43
3.3.5 SUEROS Y ANTICUERPOS	43
3.3.6 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	45

4	RESULTADOS	46
4.1	PAPEL DE EIF4G EN LAS CÉLULAS INFECTADAS POR EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR, EL VIRUS DE LA GRIPE O EL VIRUS VACCINIA.	47
4.1.1	SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EIF4G EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS CELULARES.	47
4.1.1.1	Impacto del corte del eIF4G en la síntesis de proteínas celulares	48
4.1.1.2	Silenciamiento del factor de iniciación de la traducción eIF4G en células HeLa: efectos sobre la síntesis de proteínas celulares.	49
4.1.2	PAPEL DE EIF4G EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE VSV	51
4.1.2.1	Efecto del corte proteolítico de eIF4G en la síntesis de proteínas de VSV	51
4.1.2.2	Efectos del silenciamiento de factores de iniciación en la síntesis de las proteínas de VSV.	53
4.1.3	LOCALIZACIÓN DE LOS FACTORES DE LA TRADUCCIÓN EN CÉLULAS INFECTADAS CON VSV.	57
4.1.3.1	eIF4G en la traducción de los mRNAs del virus de la gripe	59
4.1.3.2	Papel de eIF4G en la síntesis de proteínas del virus de la gripe	59
4.1.4	PAPEL DE EIF4G EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS VACCINIA	59
4.1.4.1	Efecto de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la síntesis de proteínas de VV	61
4.1.4.2	Supresión funcional de los factores de iniciación de la familia 4G: efecto en la síntesis de proteínas del VV	62
4.2	PAPEL DE EIF2A EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA ENCEFALOMIOCARDITIS.	64
4.2.1	SUPRESIÓN FUNCIONAL DE EIF2 α POR SILENCIAMIENTO: EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE EMCV	64
4.2.2	INDUCCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE EIF2 α EN LA TRADUCCIÓN CELULAR DE EMCV	65
4.2.3	DISTRIBUCIÓN DE LA MAQUINARIA DE TRADUCCIÓN EN LAS CÉLULAS INFECTADAS POR VSV Y EMCV	67
4.2.3.1	Localización de los factores de la traducción en células infectadas con VSV.	67
4.2.3.2	Localización subcelular de eIFs y ribosomas en las células infectadas por EMCV.	68
5	DISCUSIÓN	71
5.1	FACTOR EIF4G	73
5.2	IMPLICACIÓN DE EIF2α EN LA TRADUCCIÓN VIRAL	76
5.3	EIF4F Y EIF2 DEFINEN MECANISMOS DUALES DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN VIRUS.	78
6	CONCLUSIONES	81
7	BIBLIOGRAFÍA	86
8	ANEXO	100

Abreviaturas

Abreviaturas

2A ^{pro}	Proteasa 2A
3C ^{pro}	Proteasa 3C
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CBP	Proteína de unión a <i>cap</i>
Ci	Curio
Col.	Colaboradores
C-t	Dominio Carboxilo-terminal de eIF4G
DCP	Proteína de eliminación de <i>cap</i>
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ADN, ácido desoxirribonucleico
DS	Cadena doble
eIF	Factor de iniciación eucariótico
EMCV	Virus de la Encefalomiocarditis
FLU	Virus de la Gripe
FMDV	Virus de la Fiebre Aftosa
GAP	Proteína de la activación de GTP
GCN	Quinasa de control general no-derepresible
GEF	Factor del intercambio de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Guanosín trifosfato
hpe	horas post-electroporación
hpi	horas post-infección
hpt	horas post-transfección
HRV	Rhinovirus humano
IFIH-I	Helicasa I inducida por IFN
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma
Kb/s	Kilobase/s
L ^{pro}	Proteasa L
Luc	Luciferasa
Met-tRNA _i	tRNA iniciador unido a metionina
Mnk1	Quinasa activada por mitógeno 1
mRNA	ARN (<i>RNA</i>) mensajero

nt	Nucleótido
N-t	Dominio amino-terminal de eIF4G
ORF	Marco de lectura abierta
PABP	Proteína de unión a la cola de poli(A)
Paip	Proteína de unión a PABP
PAMP	Patrón molecular asociado a los patógenos
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Quinasa de retículo endoplásmico
PKR	Proteína quinasa R
Poli(A)	Poliadenosina
PTB	Proteína de unión a tramos de polipirimidinas
PV	Virus de la polio
RBM	Motivos del reconocimiento del RNA
RdRP	Polimerasa dependiente de ARN (<i>RNA</i>)
RIG-I	Gen-I inducible por ácido retinoico
RNA	ARN, ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RRL	Reticulocitos de conejo
rRNA	ARN (<i>RNA</i>) ribosómico
RT	Retrotranscripción
sg-mRNA	ARN (<i>RNA</i>) subgenómico
siRNA	ARN (<i>RNA</i>) pequeño de interferencia
SS	Cadena sencilla
SV	Virus Sindbis
Tet	Tetraciclina
TLR3	Receptor parecido a Toll 3
tRNA	ARN (<i>RNA</i>) de transferencia
UTR	Región no traducida
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
VV	Virus Vaccinia

Summary

Resumen en inglés (Summary)

Cytolytic viruses abrogate host protein synthesis to maximize the translation of their own mRNAs. In this thesis doctoral, we analyzed the translation initiation factor requirements for translation of Vesicular stomatitis virus (VSV), Vaccinia virus (VV), Encephalomyocarditis virus (EMCV), Foot-And-Mouth Disease virus (FMDV), Influenza virus (FLU) and Sindbis virus (SV) mRNAs in cells using different strategies. The first one is based on depletion of eIFs by siRNAs: silencing of eIF4GI and eIF4GII only slightly affects VSV infection, whereas it has a much greater effect in cellular, FLU and VV protein synthesis, showing a virus-dependent behavior regarding eIF4G involvement in initiation of translation. Another strategy used was to proteolyze eIF4G expressing poliovirus 2A protease (PV 2A^{pro}) in cultured cells and to analyze the translational effects of this functional impairment. eIF4G cleavage by PV 2A^{pro} strongly inhibits translation of FLU and VV mRNAs, whereas protein synthesis directed by VSV mRNAs is not abrogated in agreement with silencing experiments. Taken together, these results suggest two opposite translation mechanisms for three distinct animal viruses (two negative stranded RNA, FLU and VSV, and one double stranded DNA, VV, viruses) regarding to the canonical cap-dependent translation.

Depletion of eIF2 α induces a slight delay in the kinetics of EMCV protein synthesis, whereas at late times post infection the levels of viral translation are similar in control and eIF2 α -depleted HeLa cells. These data suggest that EMCV RNA is translated by an eIF2 α -independent mechanism in infected cells.

Introducción

Los virus animales han desarrollado numerosas estrategias para expresar eficientemente su información genética. Estas estrategias incluyen sofisticados mecanismos para monopolizar la maquinaria de traducción celular. En la mayoría de los casos, la fase tardía de la infección por virus citolíticos conlleva una fuerte inhibición de la traducción de los mRNAs celulares, mientras que las proteínas estructurales que darán lugar a nuevas partículas virales se sintetizan con gran eficacia. Así pues, la infección de células por virus animales constituye un importante modelo para estudiar la regulación de la traducción de mRNAs celulares y virales. En la mayoría de los casos esta regulación se debe a diferencias en el proceso de la iniciación de la traducción de ambos tipos de mRNAs.

1.1 La iniciación de la traducción en células eucariotas

La traducción del mRNA en proteína representa la última fase de la expresión genética, que determina la composición del proteoma celular a partir de la información contenida en los mRNAs (Gebauer and Hentze, 2004). Este proceso se ha dividido en cuatro fases: iniciación, elongación ó polimerización, terminación y reciclaje. El paso de la iniciación es una de las etapas más finamente reguladas en la expresión genética y es mediada por los factores de la iniciación de la traducción (eIFs, *eukaryotic initiation factors*) (Acker and Lorsch, 2008; Kapp and Lorsch, 2004; Marintchev and Wagner, 2004)

1.1.1 Mecanismos de iniciación de la traducción

1.1.1.1 Mecanismo dependiente del *cap*

La iniciación de la traducción puede ser dividida en tres partes. La primera consta del ensamblaje del factor de la iniciación de la traducción 2 (eIF2), GTP y el Met-tRNA_i para formar el complejo ternario. eIF2 se une con mayor afinidad a GDP que a GTP, de modo que el complejo eIF2-GDP que se produce después de cada ronda de traducción tiene que ser reciclado para dar lugar de nuevo a eIF2-GTP antes del comienzo de una nueva ronda de traducción. Este proceso está facilitado por el factor de reciclaje eIF2B [*guanine nucleotide exchange factor* o GEF] (Kapp and Lorsch, 2004; Preiss and M, 2003; Sonenberg and Dever, 2003). Después de su formación, el complejo ternario Met-tRNA_i-eIF2-GTP se une a la subunidad 40S del ribosoma, dando lugar al complejo 43S (Kapp and Lorsch, 2004; Pestova et al., 2001; Preiss and M, 2003).

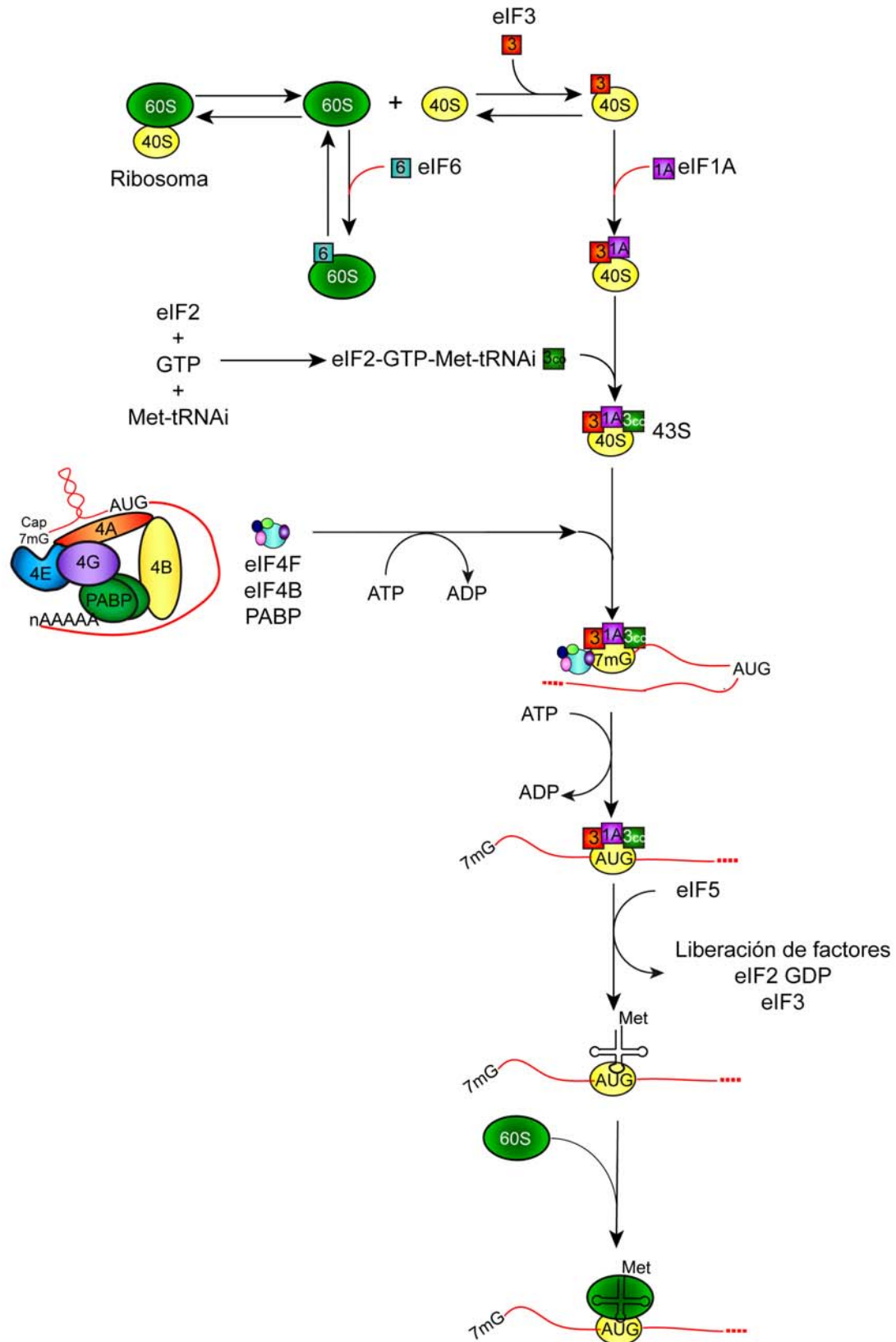


Figura 1. Mecanismos de la iniciación de la traducción. A) Disociación de las subunidades 40S y 60S del ribosoma. B) Asociación de la subunidad ribosómica 40S con eIF3, eIF1A y el complejo ternario GTP- eIF2-Met-tRNAi. C) Reconocimiento del mRNA por eIF4F. D) Unión de la subunidad ribosómica 40S al mRNA. E) Unión de la subunidad ribosómica 60S a la 40S, asociada al mRNA. Adaptado de Gingras y col. (Gingras, Raught, and Sonenberg, 1999).

Este proceso está facilitado en gran medida por eIF1, eIF1A y eIF3, factores que se unen simultáneamente a la subunidad 40S del ribosoma y que impiden su reasociación a la subunidad 60S. La segunda fase de la iniciación de la traducción consiste en el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5' del mRNA. En primer lugar, la estructura “cap” (m^7GpppN) del mRNA es reconocida y unida por eIF4E, que forma parte del complejo eIF4F. Este complejo consiste, aparte de eIF4E, en otros dos factores, eIF4G y eIF4A. La interacción entre eIF4G y eIF4E induce un cambio conformacional en el complejo y sus componentes que aumenta su afinidad por la estructura “cap” del mRNA (Tarun and Sachs, 1997; Wells et al., 1998). eIF4A es una helicasa de RNA (DEAD-box RNA helicase) que elimina las estructuras secundarias presentes en la 5'UTR del mRNA. Su actividad es incrementada por eIF4B y eIF4H. Por otro lado, la cola de Poli(A), que se localiza en el extremo 3' del mRNA, se une a la proteína de la unión a la cola de Poli(A) (PABP, *poly(A)-binding protein*). PABP interacciona con eIF4G e induce que el mRNA adopte una conformación circular, facilitando el reciclado de los ribosomas. eIF3 actúa como un puente molecular interaccionando con eIF4G y la subunidad 40S del ribosoma (Acker and Lorsch, 2008; Jackson, Hellen, and Pestova; Sonenberg and Dever, 2003).

El siguiente paso en la traducción es el “scanning” de la región 5' UTR y el reconocimiento del codón AUG de inicio. Durante este proceso, las estructuras secundarias en torno al AUG iniciador son eliminadas por la actividad RNA helicasa de eIF4A. Normalmente es el primer triplete AUG con una purina en el sitio -3 y una guanina en el sitio +4. El complejo 43S reconoce los codones formando un apareamiento de bases entre el anticodón del Met-tRNA_i y el AUG iniciador. La interacción del complejo de preiniciación 43S y codón AUG iniciador resulta en la formación de un complejo estable conocido como 48S (Acker and Lorsch, 2008; Gebauer and Hentze, 2004; Jackson, Hellen, and Pestova).

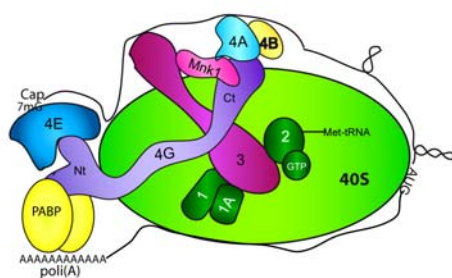


Figura 2. Complejo de la iniciación de la traducción. Representación esquemática de las interacciones entre los factores de la iniciación de la traducción unidos a la subunidad 40S y al RNA mensajero (mRNA) con la estructura cap y cola de Poli(A).

En el complejo 48S están presentes ciertos factores que tienen que ser desplazados antes de que la subunidad 40S, el mRNA y el complejo ternario puedan acoplarse con la subunidad 60S. La unión de las subunidades para formar el complejo 80S previa a la fase de elongación implica dos eventos consecutivos: i) la hidrólisis del GTP unido a eIF2 e ii) la hidrólisis del GTP unido a eIF5B.

1.1.1.2 Mecanismo de iniciación independiente del cap

La síntesis de proteínas puede producirse mediante un mecanismo alternativo, en el cual el ribosoma es reclutado, colocado y activado en un sitio distinto del extremo 5' del RNA (estructura cap), conocido como sitio de entrada interna del ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*). Esta secuencia requiere la unión directa de la subunidad ribosómica 40S y ciertos factores canónicos y no canónicos de la iniciación de la traducción con una región específica del mRNA que normalmente precede al AUG iniciador. Los IRES se describieron por primera vez en picornavirus pero posteriormente se han descubierto en virus de diferentes familias, así como en mRNAs de células eucariotas. En muchos casos los IRES permiten la traducción en condiciones de inhibición general de la síntesis de proteínas, tales como falta de aminoácidos, muerte celular, hipoxia, choque térmico, durante la fase G2 / M del ciclo celular, y a menudo reducen sustancialmente el requerimiento de los factores de la iniciación (Hellen and Sarnow, 2001; Pelletier and Sonenberg, 1988).

La actividad de los IRES está bajo el control de la mayoría de los factores de iniciación (eIFs) y los factores específicos de IRES (ITAFs – IRES-specific Trans Acting Factors). Los ITAFs pueden condicionar el reclutamiento del ribosoma al IRES y la propia estructura secundaria del RNA (Spriggs et al., 2005). La eficiencia de la traducción mediada por IRES puede variar según el tipo de célula, por tanto, del “fondo genético”, pero también del estado fisiológico de la célula y de las variaciones del “proteoma” celular en respuesta a diferentes situaciones. No se han observado similitudes en las secuencias de los elementos IRES, tamaño o estructura, a excepción de aquellos provenientes de familias de virus relacionados. Este hecho implica que no existe una estructura universal para los IRES.

1.1.2 Factores de la iniciación de la traducción

1.1.2.1 El factor eIF4G

El factor de iniciación eIF4G ha sido aislado y clonado a partir de muchas especies diferentes, incluyendo las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, *Drosophila*, *Triticum spp* y *Homo sapiens*. Existen dos formas de eIF4G que muestran moderada conservación en la secuencia (46% de identidad en humanos, 53% en levadura), pero que comparten similares actividades bioquímicas (Figura 3). Además de estos homólogos funcionales, la familia eIF4G también contiene proteínas que muestran cierta conservación de secuencia únicamente en su región C-t de eIF4GI. Por ejemplo, p97/NAT1/DAP-5 (p97) (30% de homología con eIF4GI) es una proteína ubicua y abundante en distintas líneas celulares y tejidos. p97 carece del extremo N-terminal de eIF4GI que contiene los sitios de unión a la cola de poli(A) y eIF4E pero posee

dominios que interactúan tanto con eIF3 como eIF4A. Por último, la proteína de interacción con PABP (Paip-1, PABP *interaction protein*) muestra una modesta homología con el dominio central de eIF4GI y puede unir *in vitro* eIF4A (Craig et al., 1998; Imataka, Olsen, and Sonenberg, 1997; Levy-Strumpf et al., 1997; Prevot, Darlix, and Ohlmann, 2003; Yamanaka et al., 1997).

El eIF4GI es un polipéptido de gran tamaño que interactúa con muchas proteínas diferentes, tanto celulares como virales, tales como: (i) las proteínas de unión al cap citoplasmica y nuclear eIF4E y CBP80, respectivamente, así como otros factores de iniciación de la traducción como eIF4A y eIF3; (ii) proteasas de distintos virus, tales como 2A y L, (iii) proteínas virales, como NS1 y PB2 de la gripe, NSP3 de rotavirus y 100KD de adenovirus; (iv) la proteína de choque térmico HSP27; (v) otras proteínas implicadas en el metabolismo de RNA, como PABP, la enzima implicada en la eliminación del cap 1 (DCP1, *decapping protein 1*), y la quinasa Mnk1 (MAP kinase-interacting kinase 1) (Aragon et al., 2000; Cuesta, Laroia, and Schneider, 2000; Foeger, Glaser, and Skern, 2002; Fortes et al., 2000; Hernandez and Vazquez-Pianzola, 2005; Imataka, Gradi, and Sonenberg, 1998; Lamphear et al., 1995; Le et al., 1997; Mader et al., 1995; McKendrick et al., 2001; Piron et al., 1998; Pyronnet et al., 1999; Vilela et al., 2000). El eIF4G desempeña un papel central, actuando como un puente molecular entre el mRNA y la subunidad ribosómica 40S. Une simultánea e indirectamente los dos extremos del mRNA (cap y cola de poli(A)) mediante su interacción con el eIF4E y PABP, respectivamente. Además, recluta al entorno del mRNA a la subunidad 40S a través de la interacción con el eIF3. De esta manera el eIF4G desempeña un papel central en la iniciación de la traducción. El factor eIF4G es fosforilado en respuesta a suero, aunque su papel funcional aun no está claro. Se ha propuesto que esta modificación post-traducciona aumenta la actividad del factor para reclutar ribosomas. eIF4GI es fosforilado en condiciones de estrés por la quinasa pak-2 en el sitio de unión con eIF4E, afectando negativamente la traducción dependiente del cap. Las interacciones entre eIF4E/eIF4G y PABP/eIF4G da lugar a que el mRNA adopte una conformación circular, lo que estimularía la iniciación de la traducción en el modelo conocido como “*close loop*” (Svitkin et al., 2001).

El homólogo de eIF4G conocido como p97, no contiene una región correspondiente a la región amino-terminal de eIF4G, que incluye los sitios de unión al eIF4E y PABP. Así pues, p97 se parece al producto carboxi-terminal del eIF4G después de ser hidrolizado por algunas proteasas de picornavirus (Sección 1.2.1). Debido a esto, p97 no promueve la traducción cap-dependiente, pero podría promover la traducción cap-independiente. De hecho, p97 inhibe la traducción dependiente de *cap* (Gingras, Raught, and Sonenberg, 1999; Imataka and Sonenberg, 1997; Yamanaka et al., 1997) mediante el secuestro de eIF3 y eIF4A (Imataka, Olsen, and Sonenberg, 1997; Yamanaka et al., 1997).

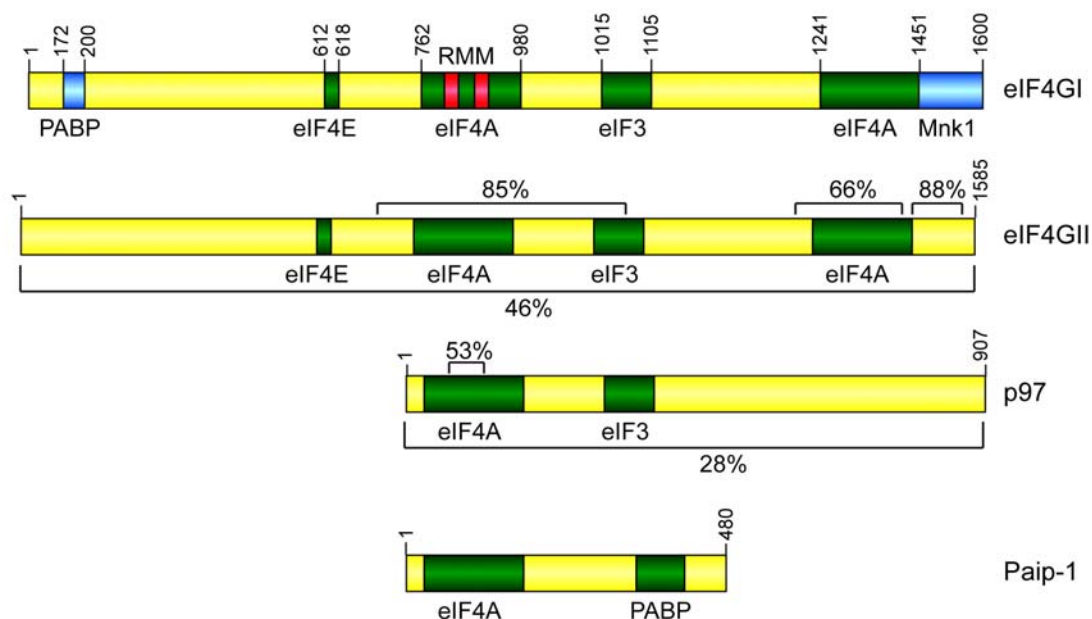


Figura 3. Familia eIF4G. eIF4GI, eIF4GII, p97 y Paip-1 se representan esquemáticamente. Se muestran dominios de interacción entre eIF4GI y eIF4A, eIF3, Mnk-1, PABP y eIF4E, y la posición de los aminoácidos de cada dominio individual está indicada. La homología entre eIF4GII y p97 con eIF4GI se expresan como porcentaje de la identidad de los aminoácidos. La numeración se muestra en relación con el extremo amino-terminal.

Este hecho hace posible que p97 actúe como un factor pro-apoptótico, inhibiendo la traducción cap-dependiente durante la muerte celular por apoptosis, junto con la hidrólisis de eIF4G y PABP que tiene lugar en estas condiciones (Clemens, Bushell, and Morley, 1998; Gingras, Raught, and Sonenberg, 1999; Marissen and Lloyd, 1998). También se ha descrito que p97 es proteolizado por la activación de la caspasa 3 generando una forma de menor tamaño, conocido como p86, que promueve la traducción cap-independiente dirigida por ciertos IRES contenidos por mRNAs celulares en estas condiciones.

1.1.2.2 El factor eIF4A

El eIF4A es un polipéptido de 46 kDa en mamíferos que exhibe la actividad ATPasa dependiente del RNA y actividades bidireccionales de la helicasa de RNA (Grifo et al., 1983; Lorsch and Herschlag, 1998; Rozen et al., 1990). El eIF4A es el prototipo de una familia de proteínas (que consiste en más de 28 miembros) denominada familia DEAD-box, por uno de los motivos compartidos por todos los miembros de la familia. Estas proteínas participan en diversos procesos, aparte de la traducción, incluyendo el splicing del pre-mRNA, biogénesis de los ribosomas, el desarrollo, espermatogénesis y oogénesis. Todos los miembros de la familia se ha demostrado que poseen actividad NTPasa, pero sólo unos pocos miembros, además de eIF4A demostraron que poseen la actividad de helicasa con doble cadena de RNA (Liang, Diehl-Jones, and Lasko, 1994; Raghunathan and Guthrie, 1998; Wagner et al., 1998; Wang, Wagner, and

Guthrie, 1998). Existen tres isoformas en mamíferos: eIF4AI, eIF4AII y eIF4AIII. El eIF4AII humano posee una gran homología con el eIF4AI (89% de identidad) y es funcionalmente equivalente, pero su expresión específica de tejido y la regulación del desarrollo le diferencian del eIF4AI (Gingras, Raught, and Sonenberg, 1999).

1.1.2.3 El factor eIF4E

El eIF4E se descubrió como una proteína que promueve la iniciación de la traducción dependiente del cap. Como factor de iniciación canónica, el eIF4E tiene la capacidad de influir en la expresión de prácticamente todas las proteínas en la célula (Rhoads, 2009). Las funciones del eIF4E están vinculadas a la presencia en este factor de un sitio de unión al *cap* y a su interacción con varias proteínas, que podrían modular la función y actividad de este factor (von der Haar et al., 2004). En células eucarióticas, se han caracterizado muchas proteínas diferentes, relacionadas con el eIF4E: 3 en mamíferos, denominadas eIF4E-1, 4EHP y eIF4E-3; tres en plantas denominadas eIF4E, eIF(iso)4E, y la nueva proteína de la unión al *cap* – nCBP; 5 en *C. elegans*, 2 en los peces cebra, 2 en *Xenopus*, 2 en *S. pombe*, 2 en *Leishmania* y 8 de *Drosophila*. En contraste, sólo un gen de eIF4E está presente en *S. cerevisiae*. Curiosamente, el primer gen viral relacionado con eIF4E fue descubierto recientemente en Mimivirus, el mayor virus eucariótico conocido hasta la fecha (Browning et al., 1992; Hernandez and Vazquez-Pianzola, 2005; Metz, Timmer, and Browning, 1992; Rychlik, Russ, and Rhoads, 1987; Sonenberg et al., 1979; Yoffe et al., 2004). Joshi *et al.* (Joshi et al., 2005), han combinado secuencias de eIF4E publicadas con las secuencias extraídas del GenBankTM para identificar 411 miembros de la familia eIF4E en 230 especies.

Basado en el número de miembros que componen la familia del eIF4E y el número de las proteínas con las que interaccionan, sus funciones pueden ser muy diversas. A pesar de que el eIF4E y la mayoría de las proteínas relacionadas con 4E, se cree que promueven la iniciación de la traducción, algunos miembros de esta familia también pueden funcionar como represores de la traducción. El 4EHP (eIF4E-2) humano presenta similitud de secuencia y está estructuralmente relacionado con el eIF4E. Sin embargo, el 4EHP y el eIF4E-8/d4EHP se unen a la estructura *cap*, pero no al eIF4G y por lo tanto pueden actuar como represores de traducción (Hernandez and Vazquez-Pianzola, 2005; Rom et al., 1998). Por otra parte, el eIF4E humano también participa en el transporte nuclear del conjunto de los mRNAs que contienen una estructura conocida como un elemento de la sensibilidad de 4E (Culjkovic, Topisirovic, and Borden, 2007; Strudwick and Borden, 2002). El eIF4E entra en el núcleo uniéndose a una proteína conocida como 4E-Transportador (4E-T) (Dostie et al., 2000). Una vez en el núcleo, el eIF4E interacciona con el *cap* de ciertas poblaciones de mRNAs y promueve su exportación al

citoplasma (Cohen et al., 2001; Lai and Borden, 2000; Rousseau et al., 1996; Topisirovic, Capili, and Borden, 2002)

El eIF4E es un factor limitante en la mayoría de tipos de células. Sin embargo, su nivel basal es elevado en células tumorales, líneas celulares estables y en reticulocitos de conejo (RRL). El hecho de que el eIF4E sea limitante y esencial para la iniciación de la traducción, le convierte en un objetivo lógico para controlar la síntesis de proteínas. En efecto, existen por lo menos tres mecanismos diferentes para regular la actividad del eIF4E: (a) transcripción, (b) fosforilación, y (c) unión de proteínas inhibidoras (Duncan, Milburn, and Hershey, 1987; Rau et al., 1996; Raught and Gingras, 1999; Sonenberg and Gingras, 1998). Estas proteínas inhibidoras, conocidas como proteínas de unión a 4E (4E-BP, 4E-binding proteins) son desactivadas por fosforilación en condiciones celulares favorables por la quinasa mTOR y son de especial importancia en el control de la traducción ejercida por ciertos virus (Alain et al.).

El factor eIF4E tiene como función reconocer y unirse a la estructura “cap” de los mRNAs celulares. A su vez, recluta la maquinaria de síntesis de proteínas en la proximidad del mRNA mediante su interacción proteína-proteína con eIF4G. El eIF4E es fosforilado por Mnk 1 y se ha propuesto que dicha fosforilación aumenta su actividad (Morley and Naegele, 2002; Morley and Naegele, 2003). Esta quinasa es activada en condiciones óptimas para la célula y es inactivada como consecuencia del estrés celular o ciertas infecciones virales (Moerke et al., 2007; Morino et al., 2000; Svitkin et al., 2005).

1.1.2.4 El factor eIF2

Este factor de iniciación de la traducción se caracterizó hace mas de 30 años por su capacidad para formar un complejo ternario con GTP y el Met-tRNA iniciador (Met-tRNA_i) para unirse posteriormente a la subunidad ribosómica 40S. Este complejo Met-tRNA_i•eIF2•GTP actuará como cebador para iniciar la síntesis de la cadena polipeptídica (Schmitt, Naveau, and Mechulam). La unión del anticodón de Met-tRNA y el codón AUG provoca la hidrólisis de GTP por eIF2. A continuación, eIF2 GDP se disocia del tRNA iniciador y del ribosoma. Después de la liberación, eIF2-GDP se recicla a eIF2-GTP a través de la acción del factor eIF2B. La reacción de intercambio de GDP por GTP es un proceso clave para el control de la traducción. De hecho, la inhibición de la actividad eIF2B impide el reciclaje de eIF2, reduciendo así la iniciación de la traducción y el crecimiento celular (Bommer et al., 1991; Schmitt, Naveau, and Mechulam; Ventoso et al., 2006).

El eIF2 es un heterodímero que consta de tres subunidades: α , β y γ (Figura 4), cada una con diferente tamaño (36, 38 y 52 kDa respectivamente) (Hershey, 1991; Imataka, Gradi, and Sonenberg, 1998; Merrick, 1992). El eIF2 α y β se unen a la subunidad γ , pero no interaccionan

entre ellas. El eIF2 α y el eIF2 γ permanecen asociadas de una manera muy estable, e incluso la subunidad α estimula la unión de Met-tRNA_i por eIF2 γ . El eIF2 α contiene tres dominios. En células eucarióticas, la serina dentro del bucle de dominio 1 puede ser fosforilado por varios tipos de quinasas. La fosforilación de este residuo es fundamental para el control de la traducción. Se han identificado cuatro quinasas de eIF2 α , cada una es capaz de responder a una forma diferente de estrés. La quinasa GCN2 (*General control non-derepressible-2*), que se activa frente a la falta de aminoácidos; la proteína activada por dsRNA (PKR) (Protein Kinase-R), que juega un papel clave en la respuesta anti-viral de la célula; la quinasa PKR-like (PERK) (*protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*) que se activa en respuesta a una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE; el inhibidor hemo-regulado (HRI) (Hepatic Heme-Regulated Inhibitor) (Raven and Koromilas, 2008).

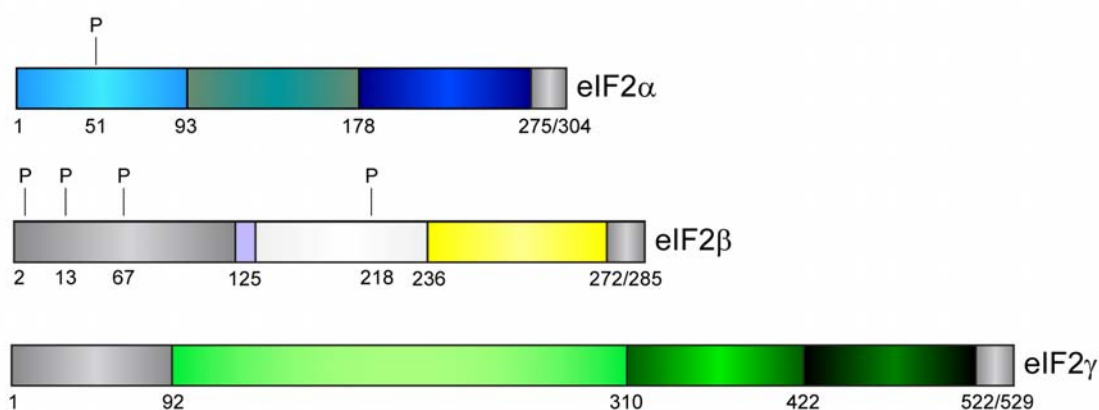


Figura 4. Estructura de dominios de las subunidades α , β y γ de eIF2 eucariótico. El número de aminoácidos en cada subunidad eIF2 se muestra debajo de las imágenes. Los sitios de fosforilación conocidos están representados por una “P” sobre las cajas, con el número de residuo debajo.

El eIF2 β en eucariotas es rico en carga positiva en el dominio N-terminal (igual que eIF2 α), e interacciona con GAP y GEF, eIF5 y eIF2B respectivamente (Dever, 2002; Marintchev and Wagner, 2004). La parte C-terminal de eIF2 β contiene el dominio de unión del factor de intercambio de nucleótidos de guanina, eIF2B junto con un motivo de dedos de Zinc (*Zinc Finger*) (Kimball, 1999). La secuencia de eIF2 γ contiene todos los elementos necesarios para la unión de nucleótidos. Por lo tanto, se propuso que esta subunidad es suficiente para la unión de GDP y GTP. Por otra parte, se ha sugerido que la subunidad γ también puede interactuar directamente con el tRNA iniciador (Schmitt, Naveau, and Mechulam).

La actividad del eIF2 está regulada por procesos de fosforilación/defosforilación en respuesta a estímulos externos o internos, como por ejemplo: hemo-deficiencia, infección viral, o los altos niveles de RNA de cadena doble, falta de aminoácidos y nutrientes, carencia de suero y de factor de crecimiento, choque térmico, metales pesados y la liberación de calcio desde el

RE, producido por ciertos estreses celulares (Burda et al., 1998; De Benedetti and Baglioni, 1986; Duncan, Milburn, and Hershey, 1987; Ito, Jagus, and May, 1994; Kaufman et al., 1989; Laitusis, Brostrom, and Brostrom, 1999; Matts et al., 1991; Prostko et al., 1992; Scorsone et al., 1987). Además, algunos agentes oxidantes, tales como el glutatión oxidado, arsenito sódico, la acumulación de proteínas desnaturalizadas y óxido nítrico también estimulan la fosforilación del eIF2 α . Estudios recientes sugieren que la fosforilación del eIF2 α juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo, en la consolidación de la memoria (Costa-Mattioli et al., 2007; Costa-Mattioli and Sonenberg, 2006) y en la apoptosis. La fosforilación de este factor se reconoce como un mecanismo importante en la regulación de la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos (Gerlitz, Jagus, and Elroy-Stein, 2002; Sudhakar et al., 2000; Wek, Jiang, and Anthony, 2006).

1.2 Regulación de la traducción en células infectadas por virus

Los virus RNA se dividen en grupos dependiendo del genoma que presenta la partícula viral: RNA de polaridad positiva (+), RNA de polaridad negativa (-), RNA bicatenario (DS – *doble stranded*) y virus cuya replicación requiera una transcripción inversa (RT – Reverse Transcriptase). Cada uno de estos grupos tiene un mecanismo de replicación distinto. En los virus RNA positivo, el genoma se comporta como un mRNA y puede ser traducido inmediatamente después de la infección de la célula hospedadora (ej: picornavirus, togavirus, flavivirus). En los RNA negativos el genoma es complementario al mRNA. Para poder sintetizar las proteínas virales se requiere la síntesis de la hebra complementaria de polaridad positiva. Este es el caso de orthomixovirus, paramixovirus y rabdovirus. Estos virus necesitan la polimerasa RNA dependiente del RNA al igual que los virus con material genético DS RNA cuyo genoma es de cadena doble y por lo tanto no puede funcionar como mRNA. Los virus que copian su RNA a DNA son los retrovirus. En este caso, el RNA aunque positivo, sirve como molde para la transcriptasa inversa y es copiado a DNA (Carrasco, 2006a; Hunt, 2010).

Los virus dependen de la maquinaria de traducción celular para la síntesis de sus proteínas, ya que este proceso es extremadamente complejo y requiere numerosos componentes que no pueden ser codificados en sus genomas. Por tanto, los mRNAs de los virus deben competir con los mRNAs celulares por los ribosomas y otros componentes de la maquinaria de traducción (Schneider and Mohr, 2003). En las últimas décadas se han descrito diversas estructuras presentes en los mRNAs tardíos de ciertos virus que son capaces de reclutar los complejos de iniciación de la traducción de forma “no canónica”, es decir, en situaciones de déficit de ciertos factores de iniciación de la traducción (Martinez-Salas et al., 2002). También, la traducción de los mRNAs virales está acoplada a su transcripción (Sanz, Castello, and Carrasco, 2007). Esto significa que en las células infectadas por virus sólo se traducen

eficazmente aquellos mRNAs que provienen de la transcripción viral, y no los que se introducen exógenamente en las células, independientemente de que posean o no las estructuras asociadas a los mRNAs del virus en cuestión. Por tanto, los RNAs virales no sólo deben competir contra los mRNAs celulares por la maquinaria de síntesis de proteínas, sino también contra las condiciones adversas que se producen en la célula como consecuencia de la infección. Como respuesta a estos eventos los virus disponen de herramientas para manipular los complejos de traducción para apoderarse de todo el esfuerzo biosintético de la célula hospedadora (Prevot et al., 2003; Schneider and Mohr, 2003). En este sentido existen 3 eIFs claves en la regulación de la traducción mediada por virus: eIF4E, eIF4G y eIF2.

1.2.1 Los picornavirus: el virus de la encefalomiocarditis

En la actualidad los virus de esta familia se clasifican en nueve grupos: Enterovirus (ej. poliovirus, PV), Cardiovirus (ej. virus de la encefalomiocarditis, EMCV), Aphthovirus (ej. virus de la fiebre aftosa, FMDV), Rhinovirus (ej. virus del resfriado común, HRV), Hepatovirus (ej. virus de la hepatitis A), Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus y Teschovirus. Los picornavirus son estructuralmente simples y aparecen como partículas esféricas de ~ 30 nm de diámetro que poseen simetría icosaédrica. Estas partículas virales se componen únicamente de RNA y proteínas sin envuelta lipídica. Contienen 60 unidades idénticas, cada una formada por una copia de cada una de las proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4), aunque sólo tres están en la superficie del virión, además de una copia del genoma de RNA con una copia de la proteína unida al genoma (VPg). Esta proteína genómica está unida covalentemente al extremo 5' del RNA viral a través de un enlace éster. La traducción del RNA viral tiene lugar principalmente a partir de un sitio de iniciación único produciendo un polipéptido precursor de gran tamaño, que representa la mayor parte de la capacidad máxima de codificación del genoma. La poliproteína se procesa en una notable sucesión de cortes proteolíticos para producir proteínas virales maduras. Al menos tres actividades proteolíticas codificadas en el genoma viral están involucradas en estos cortes. Ninguno de los componentes celulares parece ser necesarios para este proceso.

El virus de la encefalomiocarditis (EMCV) es un miembro del género Cardiovirus dentro de la familia *Picornaviridae*. Al igual que otros picornavirus, la región 5' no traducida (UTR) del mRNA de EMCV es muy larga y sin estructura cap. La iniciación de la traducción del mRNA del virus se produce por un mecanismo cap-independiente, que requiere alrededor de 600 nucleótidos (nt) del 5' UTR. Este segmento de 600 nt constituye el IRES del EMCV (Figura 5 (Witherell and Wimmer, 1994)). La traducción viral tardía está acompañada de una inhibición casi completa de la síntesis de proteínas celulares. El RNA del EMCV fue el primer mRNA traducido en un sistema de traducción in vitro para estudiar el mecanismo traduccional de los

mRNAs de picornavirus. La iniciación de la síntesis de proteínas virales en RRL y en células en cultivo transfectadas con los mRNAs de este virus requiere el factor eIF2. La inactivación por fosforilación de la subunidad α del eIF2 coincide con la inhibición global de la traducción celular y la de las proteínas virales.

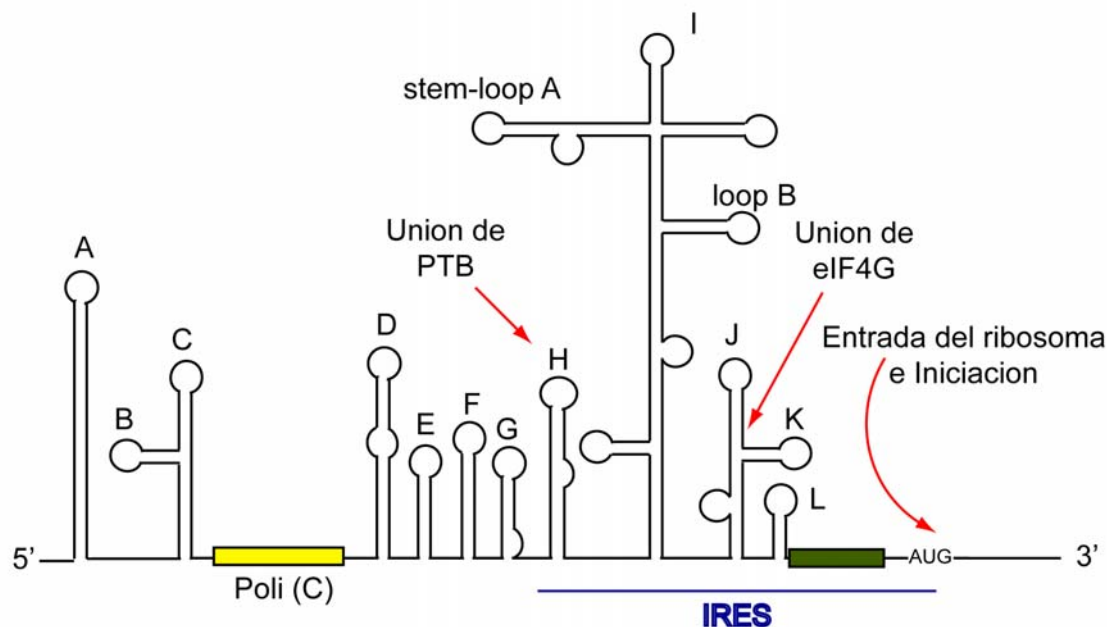


Figura 5. Representación esquemática del IRES de EMCV (IRES tipo II). El núcleo del IRES en la 5'UTR está subrayado en azul. El sitio de unión para el PTB y eIF4G están indicados con flechas, al igual que el sitio de entrada del ribosoma en el extremo 3' detrás de la cola de pirimidinas (en verde). La caja amarilla representa regiones de Poli(C).

1.2.2 Corte de eIF4G en las células infectadas por por picornavirus

Durante la replicación de ciertos picornavirus, tales como FMDV, PV o HRV (Rhinovirus), hay una potente inhibición de la traducción de los mRNAs celulares como consecuencia de la proteólisis específica de algunos factores de iniciación. Uno de los eIFs hidrolizados durante la infección por algunos picornavirus es el eIF4G. La iniciación de la síntesis de proteínas a partir del mRNA viral no se ve afectada, ya que contiene una estructura IRES (Belsham GJ, 2000; Belsham and Sonenberg, 1996). Las proteasas L^{pro} de FMDV y la $2A^{pro}$ de PV hidrolizan las dos formas del eIF4G en células en cultivo, lo que impide la interacción de los mRNAs con estructura cap a la subunidad ribosómica 40S (Figura 6) (Bernstein, Sonenberg, and Baltimore, 1985; Foeger, Glaser, and Skern, 2002). L^{pro} es capaz de romper la unión L/P1 en *trans* y probablemente también en *cis*, y también es capaz de inducir la proteólisis del eIF4G. El sitio de corte en este factor de iniciación ha sido identificado en el residuo 674 (Belsham, McInerney, and Ross-Smith, 2000; Gradi et al., 2004; Kirchweiger et al., 1994).

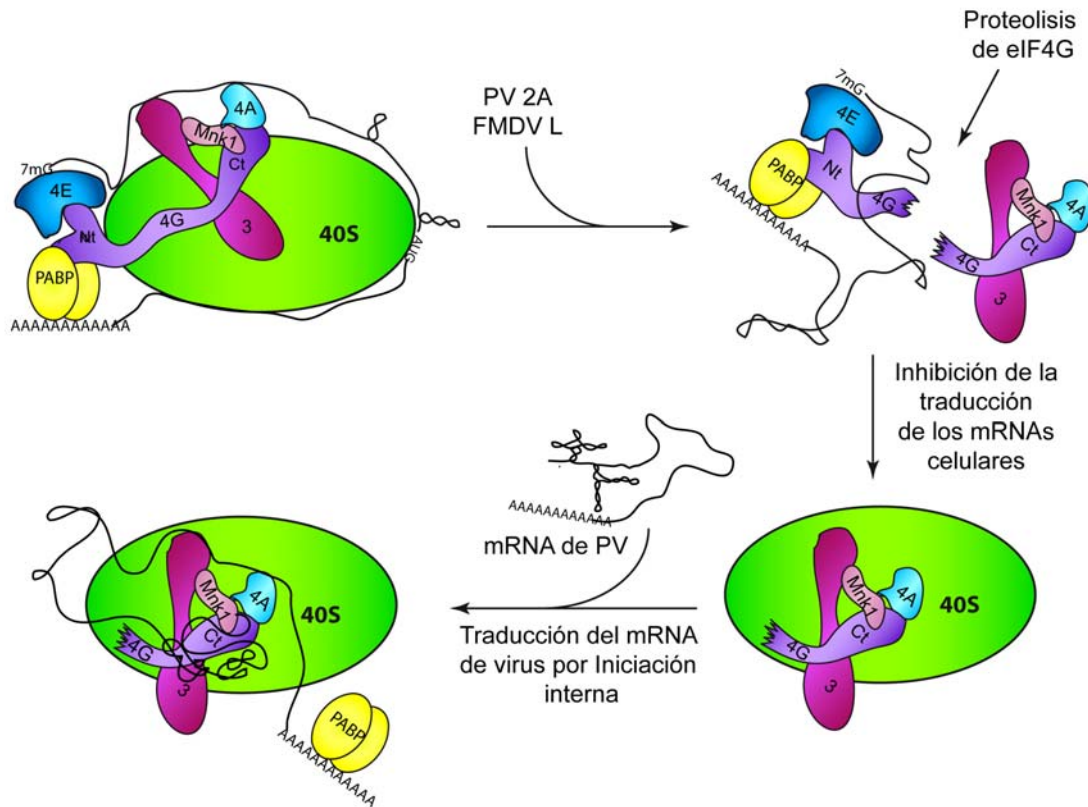


Figura 6. Esquema de la traducción de los mRNAs virales. Las proteasas de picornavirus son capaces de cortar el factor eIF4G dividiéndolo en dos partes N- y C-terminal. Este proceso inhibe la traducción celular pero la viral no esta afectada y virus puede seguir por la iniciación interna.

La 2A^{pro} de PV y de HRV lleva a cabo la separación entre el precursor de las proteínas de la cápsida y las proteínas no estructurales. También es responsable de la proteólisis de la proteína celular – eIF4G. Sin embargo, el corte no se produce en el mismo sitio que con la L^{pro}. (Lamphear et al., 1993; Seipelt et al., 1999). Sin embargo, el efecto en la síntesis de proteínas celulares y virales de la proteólisis del eIF4G es el mismo en el caso de las dos proteasas, FMDV L y PV 2A. El N-terminal de eIF4G (un tercio del eIF4G total) es escindido por la hidrólisis mediada por estas proteasas del fragmento C-terminal (dos tercios de este factor) (Figura 6) y, por tanto, el sitio de unión al eIF4E y PABP se separa del de eIF3 (Lamphear et al., 1995; Seipelt et al., 1999). A nivel funcional, este procesamiento proteolítico desacopla la capacidad de eIF4G de unir la estructura cap (eIF4E), de la de unir la subunidad menor del ribosoma (eIF3), lo que conlleva la inhibición de la traducción de los mRNAs celulares, sin impedir la traducción de los mensajeros de PV y FMDV que promueven un mecanismo iniciación interna gracias al IRES presente en su 5' UTR. El corte del eIF4GI provocado por la 2A^{pro} o por la L^{pro} se produce muy temprano en la infección y se lleva a cabo en ausencia de la replicación del RNA viral, mientras que el corte de eIF4GII es más tardío y se previene con inhibidores de la polimerasa viral (Gradi et al., 2004).

1.2.3 Fosforilación del eIF2 en células infectadas por alphavirus y por picornavirus

La primera barrera frente a la infección viral está constituida por la inmunidad innata celular. Esta puede comenzar por el reconocimiento de RNA viral de doble cadena. Las respuestas a dsRNA están mediadas por varios receptores de proteínas que reconocen este patrón molecular asociado a los patógenos (PAMP). Los más importantes de estos receptores son: receptor-3 Toll-like (TLR3), dos helicasas que contienen el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (Caspase activation and recruitment domains) - gen-I inducible por ácido retinoico (RIG-I) (Retinoic acid-inducible gene 1 protein) y la helicasa I inducida por IFN (IFIH-I), y la kinasa R de la proteína –PKR. Estos receptores de dsRNA están espacialmente separados dentro de la célula para responder a cualquier dsRNA intra- o extra-celular. Además, la respuesta antiviral activada por cada receptor difiere dependiendo del compartimento subcelular donde las señales se generan (Sadler et al., 2009). Muchos virus han desarrollado estrategias muy diferentes para inhibir la activación de PKR de los otros sensores celulares. Los adenovirus codifican un RNA, llamado VA, que es pequeño y muy abundante en las células infectadas. Este RNA viral se une de modo competitivo al dominio de la interacción con el dsRNA de PKR y otorga a la replicación viral resistencia a la acción del interferón. Otros virus producen proteínas que se unen al dsRNA y así secuestran e impiden la activación de la PKR (García, Meurs, and Esteban, 2007).

La familia de las quinasas de eIF2 α se compone de cuatro miembros: 1) HRI, cuya actividad se ve impedida por hemo *in vitro* e *in vivo*, y que se activa cuando las células son deficientes en hierro o el grupo hemo; 2) GCN2, que se activa por el tRNA deacilado como resultado de la falta de los aminoácidos; 3) PERK, que se activa por la presencia de proteínas mal plegadas en el ER y resulta en una disminución en la síntesis de proteínas mal plegadas y 4) PKR, que se activa por los RNAs de doble cadena producidos durante la replicación del virus y resulta en la inhibición de la síntesis de las proteínas virales y celulares (Chen, 2007; Kimball, 2001; Ron and Walter, 2007; Samuel, 2001).

El control de la actividad del eIF2 está mediado por la fosforilación reversible de su subunidad α . Cuando el eIF2 α está fosforilado, el complejo GDP-eIF2, generado al final de cada etapa de iniciación, se convierte en un inhibidor competitivo del factor eIF2B. Este es un factor limitante de la velocidad de intercambio de GTP. Cuando el eIF2 está fosforilado, secuestra al eIF2B lo que resulta en una reducción del intercambio de GDP por GTP. Dado que el nivel celular del eIF2B es de 10 a 20 veces menor que el nivel del eIF2, los pequeños cambios en la fosforilación del eIF2 tienen un efecto drástico en la traducción. Como la unión del GTP al eIF2 es un requisito previo para la unión de Met-tRNA_i, la fosforilación del eIF2 α inhibe eficazmente el reciclaje del eIF2 (Hinnenbusch, 2000; Montero et al., 2008; Suragani et al., 2006).

Como respuesta a la infección viral y a la consecuente presencia de dsRNA se activa la PKR lo que conduce a la dimerización y autofosforilación de la quinasa (Williams, 2001). La PKR activada fosforila la subunidad α del eIF2, lo que da lugar a la inhibición de la síntesis de proteínas y al efecto antiviral. Además, la PKR puede inducir apoptosis mediante la modulación de las actividades del eIF2 α , el factor nuclear κ B, factor activador de la transcripción-3, y p53 (Gil, Alcamí, and Esteban, 1999; Williams, 2001). La PKR tiene dos dominios: dominio catalítico C-terminal y dominio regulador N-terminal. El dominio N-terminal contiene los motivos de unión al RNA (RNA-recognition motifs - RBM). Los RBMs no sólo reconocen dsRNA para activar la PKR, sino que también sirven como un dominio de autoinhibición y como mediación de dimerización para formar la molécula de quinasa activa (Sadler et al., 2009).

La PKR ha sido considerada como un importante "punto de control" contra la invasión viral. Si los virus no pueden inactivar la vía PKR/eIF2 α o interferir con las vías proapoptóticas que actuarán posteriormente, la replicación viral se termina como resultado del bloqueo de la traducción viral y/o la activación de la apoptosis (Krishnamoorthy et al., 2008; Samuel, 2001). Para evitar los efectos inhibidores de la activación de la PKR, muchos virus expresan productos que previenen la activación de la quinasa o contrapesan la fosforilación del eIF2 α aumentando la defosforilación del factor. En algunos casos, sin embargo, la síntesis de proteínas virales puede tener lugar incluso bajo las condiciones de la elevada fosforilación del eIF2 α (Krishnamoorthy et al., 2008; Wilson et al., 2000a).

La infección de células en cultivo por alphavirus, como el virus Sindbis (SV) induce la activación de la PKR y la acumulación de formas de replicación de RNA de doble cadena. La fosforilación del eIF2 inhibe la traducción del mRNA celular, pero no la traducción dirigida por el mensajero subgenómico de SV (SV sg-mRNA) que no requiere el eIF2 para iniciar la traducción, al contrario que el mRNA genómico, que se traduce mayoritariamente en la fase temprana de la infección. Es importante destacar que el intercambio entre el mRNA genómico y subgenómico de SV está temporalmente correlacionado con la inhibición de la traducción celular (Ventoso et al., 2006). Este virus presenta un modo dual para la iniciación de la traducción que no sólo se produce con SV sg-mRNA. También se han observado estas dos fases en el estado de fosforilación del eIF2 en la infección por picornavirus donde este factor se mantiene defosforilado en las primeras horas, mientras que en las horas tardías su fosforilación es notable. El mismo efecto fue observado en el caso de la infección con Mengovirus (Sanz et al., 2009; Ventoso et al., 2006). Así pues, las distintas especies de virus animales han desarrollado diferentes estructuras en sus mRNAs y codifican para proteínas especializadas que hacen que la traducción de sus mRNAs en las células

infectadas por virus sea independiente de algunos factores de iniciación, como se muestra en las publicaciones realizadas a lo largo de este trabajo.

1.2.4 Células infectadas por el virus de la estomatitis vesicular – VSV

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un miembro prototipo del género Vesiculovirus que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* que contiene como material genético RNA de sentido negativo no segmentado. El VSV contiene una sola copia de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa que se replica y transcribe únicamente en el citoplasma celular. Los mRNAs del VSV, que tienen la estructura *cap* en su extremo terminal 5' y la cola de poli(A) en su extremo 3' dan lugar a cinco proteínas: la nucleoproteína (N) conjuntamente con la fosfoproteína (P), la polimerasa (L), la glicoproteína (G) y la proteína de la matriz (M) (Novella, 2003). Su genoma es de 11 kilobases y se expresa a través de la transcripción de una serie de mRNAs monocistrónicos, normalmente uno para cada gen viral. Este proceso requiere una RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRP) que esta codificada por el genoma viral (Barr, Whelan, and Wertz, 2002; Lyles, 2000; Whitlow, Connor, and Lyles, 2006). La nucleoproteína (N) conjuntamente con la fosfoproteína (P), la polimerasa (L) y ciertas proteínas de la célula son responsables de la transcripción y replicación viral. Además, la glicoproteína (G) participa en la entrada y salida de los virus en las células. La proteína de la matriz (M) tiene un papel multifuncional, participando: i) en el ensamblaje de nuevas partículas virales, ii) en la gemación de éstas, iii) en la inducción de la apoptosis celular y iv) en la alteración de la expresión génica celular. De hecho, se ha descrito que la proteína M podría actuar como un eIF de origen viral, mediando la traducción selectiva de los mRNAs transcritos por la maquinaria replicativa del VSV (Whitlow, Connor, and Lyles, 2008).

Los viriones de VSV son partículas con forma de bala que se dividen en dos componentes principales (Figura 7). En primer lugar, una ribonucleoproteína interna (RNP) compleja, que contiene la maquinaria de la síntesis de RNA, y en segundo lugar, una membrana externa derivada de la células previamente infectada. El genoma del VSV se encuentra en el complejo interno de la partícula del virus - RNP, y consta de una sola hebra de RNA, con los cinco genes y las secuencias reguladoras leader y tráiler, puestos en el orden: 3' (leader), N, P, M, G, L, (trailer)-5'. El VSV es un ejemplo clásico de un virus que inhibe rápida y casi totalmente la síntesis de proteínas celulares y, al mismo tiempo, promueve la síntesis de proteínas propias a partir de sus mRNAs (32, 47). La inhibición de la síntesis de proteínas del huésped en las células infectadas con VSV es parte de un programa de pre- y post-transcripcionales inducidos por el virus que provocan la inhibición de la expresión génica de la célula.

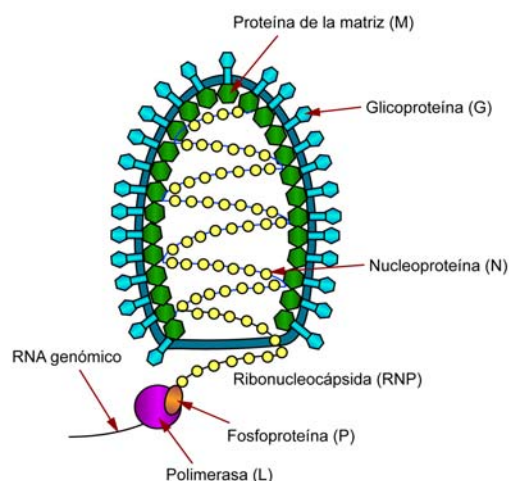


Figura 7. Representación esquemática del virión del VSV. El esquema presenta la localización de las proteínas del VSV y del RNA genómico dentro del virión.

Entre ellos, la infección induce la inhibición de la transcripción de los mRNAs celulares y su transporte núcleo-citoplasma (Lyles, 2000; Yuan, Puckett, and Lyles, 2001). Sin embargo, el bloqueo de la síntesis de proteínas del huésped no es el resultado de estos efectos inhibitorios. Se ha descrito que la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula por VSV se debe principalmente a la inhibición de la actividad de los factores de la iniciación de la traducción (Connor and Lyles, 2002; Lyles, 2000; Yuan, Puckett, and Lyles, 2001).

1.2.5 Células infectadas por el virus de la gripe

Este virus pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y contiene un genoma RNA de cadena sencilla, segmentado y de polaridad negativa. Como todos los virus con material genético RNA, el virus de la gripe también tiene una polimerasa dependiente de RNA que transcribe y replica el genoma viral. El genoma del virus consiste en ocho segmentos que están presentes en las partículas virales como complejos de ribonucleoproteínas. Las RNPs están formadas por moléculas del RNA genómico, unidas a la nucleoproteína viral (NP) y una copia del complejo de la polimerasa. Los mRNAs virales poseen en su extremo 5' terminal la estructura *cap* seguida por una secuencia de oligonucleótidos derivada de los pre-mRNAs celulares, que se genera por un mecanismo de *cap-snatching*. Además, en su extremo 3' contienen una cola de Poli(A) (Burgui et al., 2007).

El virus de la gripe utiliza un mecanismo de transcripción inusual. Los mRNAs virales, con estructura *cap* y poliadenilados, son sintetizados por la polimerasa viral, un heterodímero compuesto por tres subunidades denominadas PA, PB1 y PB2 (Elton et al., 2005). La generación del mRNA viral comienza con los oligonucleótidos capeados

y cortos de alrededor de 10 a 12 nucleótidos que se generan a partir del mRNA nuclear de la célula huésped por la actividad endonucleasa viral (Figura 10) (Plotch et al., 1981).

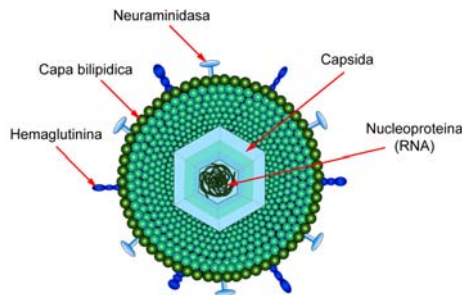


Figura 8. Esquema de la cápsula icosaédrica del virus de la gripe. Las proteínas y el material genómico están indicados con las flechas.

El reconocimiento del *cap* y su unión está producido por la subunidad PB2 (Blaas, Patzelt, and Kuechler, 1982; Ulmanen, Broni, and Krug, 1981), mientras que la subunidad PA parece ser necesaria para romper la unión entre *cap* y oligonucleótidos (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009). Además, el extremo 3' del mRNA viral está poliadenilado y en consecuencia, aunque sintetizados por diferentes vías, los mRNAs celulares y virales son estructuralmente similares (Luo et al., 1991).

La infección por el virus de la gripe comienza con su unión a un receptor de la célula, seguido de endocitosis y la liberación de los complejos de los RNAs genómicos. Estos complejos son transportados al núcleo, donde ocurre la replicación y transcripción del RNA viral. Los 5' UTRs de los mRNAs de la gripe tienen entre 20 y 50 nucleótidos con muy pocas estructuras secundarias y muy variables, que no contienen AUGs. A pesar de ser tan simples se ha descrito que son necesarios y suficientes para dirigir la traducción selectiva de los mRNAs virales durante la infección (Carrasco, 2006b).

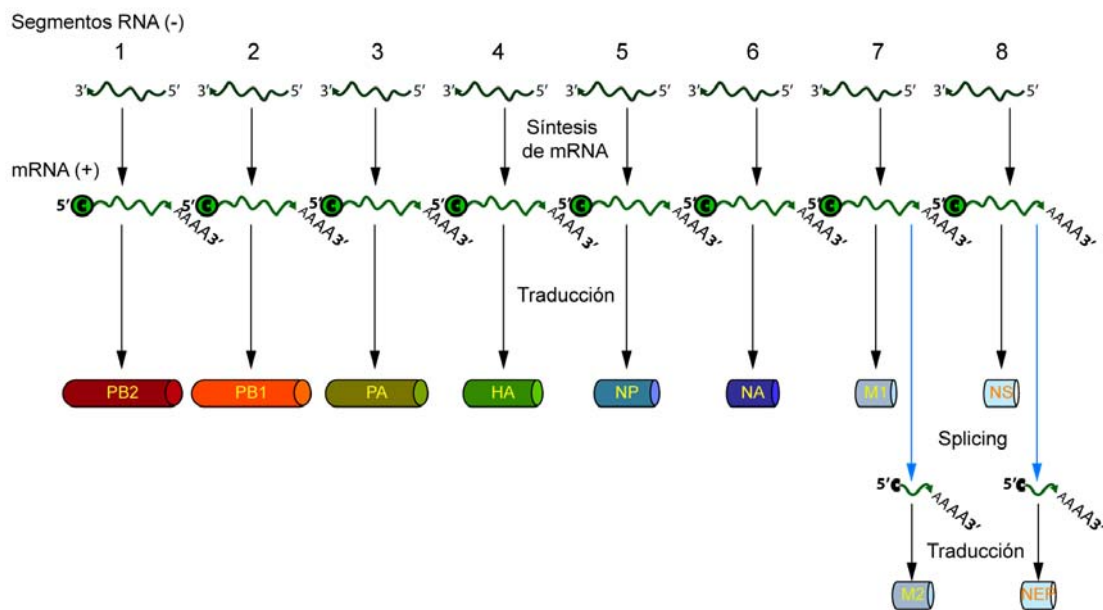


Figura 9. Esquema de la síntesis de proteínas virales de FLU. Las líneas de color verde arriba en la zona superior representan los RNAs de cadena negativa que se encuentran en el virion de la gripe. Una vez el virion entra en la célula, estos 8 RNAs se copian a mRNA de cadena (+). El mRNA es usado para la síntesis de proteínas, que se muestran en la parte inferior de la figura. Algunos segmentos de RNA codifican para más de una proteína.

La proteína de la unión al RNA, NS1, posee múltiples funciones relacionadas con la regulación de la expresión génica en las células infectadas con el virus de la gripe (Krug et al., 2003), la NS1 altera procesos claves como la poliadenilación, el splicing y la exportación al citoplasma de los mRNAs. Además, la NS1 potencia la traducción de los mRNAs virales pero no de los celulares. Se ha descrito que la proteína NS1 interacciona directamente con el eIF4GI y la PABP, pudiendo facilitar la traducción de los mensajeros virales (Aldabe et al., 1995b; Burgui et al., 2003). Recientemente, se ha descrito que el complejo de la polimerasa del virus de la gripe también interacciona con el eIF4GI (Aragon et al., 2000; Burgui et al., 2003; Yanguéz et al., 2011). No obstante, aún se desconoce el papel de estas interacciones en la expresión génica del virus y de la célula.

Objetivos

2.1 Objetivos

1. Estudiar el papel que tiene el factor eIF4G en la síntesis de proteínas de los virus VSV, FLU y VV.
2. Determinar el papel de eIF2 α en la síntesis de proteínas del virus de la encefalomiocarditis.
3. Estudiar la localización de los factores de iniciación en las células infectadas por virus

Materiales y métodos

3.1 Manipulación de células de mamífero y virus

3.1.1 Líneas celulares de mamífero

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- **HeLa** (ATCC CCL 2): células epiteliales de un carcinoma de cuello de útero humano.
- **HeLa x1/5**: línea celular derivada de la anterior producida mediante la inserción del gen de la luciferasa (*Photinus pyralis*) bajo el control transcripcional de un promotor reprimible por tetraciclina (Gossen and Bujard, 1992; Novoa and Carrasco, 1999)
- **BHK-21** (ATCC CCL 10): células de riñón de hámster neonato.
- **MEFs**: fibroblastos embrionarios de ratón. WT MEFs han sido establecidos de los MEFs primarios derivados de los embriones E11.5 y E12.5 (Ambrosino et al., 2003), e inmortalizados siguiendo el protocolo 3T3 (Todaro and Green, 1963). Fueron cedidos generosamente por Ángel Nebreda (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas).

3.1.2 Medios de cultivo para células de mamífero.

Las diferentes líneas celulares fueron cultivadas en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*Difco*), suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomycin, 0,2 µg/ml del éster butírico del ácido p-hidroxibenzoico (*Sigma*) y glutamina a una concentración de 4 mM (*Merck*). Los medios se suplementaron con suero fetal de ternera (Flow) al 10% (v/v) para el cultivo de MEFs y al 5% para el resto de líneas celulares y se mantuvieron en incubadores a 37° C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO₂ del 5%.

Las células se conservaron en nitrógeno líquido en el mismo medio con alta concentración de suero fetal bovino (20%) y del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) 7%.

En los plaques las monocapas celulares se cubrieron con medio DMEM suplementado con agar al 0,7% y suero fetal al 2% (Castrillo, 1986).

3.1.3 Electroporación de células con mRNAs sintetizados *in vitro*.

Este sistema se empleó como método de transfección de RNA desnudo en células de mamífero. Para electroporar células HeLa se siguió el protocolo descrito por el Dr, Castello para esta línea celular (Castello, 2009; Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006).

3.1.4 Transfección de siRNAs

Este método se empleó para silenciar la expresión de los factores de iniciación de la traducción. Se utilizó células HeLa al 85-90% de confluencia en placas de 24 pocillos con DMEM sin antibióticos ni antimicóticos con 5% de suero fetal bovino (SF). Se preparó la mezcla de transfección añadiendo 50µl/pocillo de Opti-MEM I *Reduced serum médium* (Invitrogen) y 0,5µg/pocillo de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) tal y como describe el proveedor. La mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante ese tiempo, se preparó mezcla con siRNAs añadiendo 50µl de Opti-Mem I y 25 pmoles de cada siRNA por pocillo a transfectar. La mezcla de lipofectamina 2000 se añadió gota a gota sobre la mezcla de siRNAs mezclándose después con suavemente con la pipeta. Tras una incubación de 20 minutos se añadió por cada pocillo 100µl de DMEM sin antibióticos, antimicóticos ni SF, seguido de la mezcla de transfección con los siRNAs. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo se cambió el medio por DMEM fresco sin antibióticos ni antimicóticos con 5% de SF. Este proceso se repitió 24 horas después de la primera transfección para lograr un silenciamiento óptimo de los distintos factores.

3.1.5 Marcaje metabólico de proteínas

El marcaje radiactivo de proteínas en cultivos celulares se realizó incubando durante una hora en DMEM sin metionina ni cisteína suplementado con 25 µCi de la mezcla *translabel* (15 mCi/ml de la mezcla [³⁵S]Met/[³⁵S]Cys) (Amersham). Las células se recogieron en tampón de carga para proteínas (Tris-HCl 0,37 M (pH 6,8), DTT 0,1 M, SDS al 1%, glicerol al 17% y azul de bromofenol al 0,024%) y se hirvieron a 95°C durante 5 minutos.

3.1.6 Microscopía confocal

Las células a estudio se cultivaron sobre cubreobjetos esterilizados a la llama, colocados previamente en las placas de 24 pocillos. A las horas indicadas en los distintos pies de figura se retiró el medio de cultivo y los cubreobjetos se lavaron con PBS. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron posteriormente 3 veces con PBS. Seguidamente se permeabilizó las células con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 10 minutos. Luego se incubó durante 2 horas con el anticuerpo primario diluido en PBS tal y como se indica en la sección de anticuerpos. Los cubres se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario conjugado a FITC diluido en PBS (1:500) durante 45 minutos. Finalmente se lavaron 3 veces con PBS, se sumergieron en agua (3 veces) y en etanol

(3 veces), secando el exceso al aire. Se montaron inmediatamente en los portaobjetos con el reactivo *ProLong Gold (Invitrogen)*. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se muestran en la sección 4.4. Las células se visualizaron en el microscopio de barrido láser confocal *LSM510* acoplado a un microscopio invertido *Axiovert 200 M (Zeiss)* utilizando el objetivo 63X/1.4 oil *Plan-Apochromat (Zeiss)*.

- **Inmunofluorescencia doble:** para detectar simultáneamente dos proteínas en la célula, se añadió a la vez dos anticuerpos primarios y dos anticuerpos secundarios y se procedió tal y como se describió anteriormente.
- **Tinción nuclear:** las células fijadas, permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos primarios se incubaron durante 45 minutos con los anticuerpos secundarios correspondientes y con una dilución 1:500 del compuesto To-Pro 3 (*Invitrogen*), mezclados en PBS. Tras 3 lavados con PBS, las muestras se procesaron y se montaron sobre los portaobjetos con *ProLong* tal y como se describe anteriormente.
- **Detección de los mRNAs por hibridación *in situ* (FISH):** para determinar la localización subcelular de los mRNAs se empleó un oligonucleótido de 50 desoxitimas conjugado a fluoresceína (OligodT-F, *Gene Link*). Las células se cultivaron sobre cubreobjetos colocados previamente en las placas de 24 pocillos y a las horas deseadas se las lavo con PBS una vez, se fijo con paraformaldehído, como se ha descrito anteriormente y se lavo 3 veces con PBS. Posteriormente se siguió el protocolo descrito por el Dr. Castelló en su tesis doctoral (Castello, 2009; Castello et al., 2009a).
- **Ratio de colocalización de fluorescencia:** Se utilizó el programa ImageJ y el plugin JACoP (Just Another Co-localization Plugin) para calcular el coeficiente de Pearson que indica el ratio de la colocalización entre dos proteínas en imágenes obtenidas con dos canales de fluorescencia distintos (Bolte and Cordelières, 2006).

3.1.7 Virus

Los virus utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- **Virus de la estomatitis vesicular (Vesicular Stomatitis Virus - VSV):** Familia *Rhabdoviridae*, cepa Indiana. Este virus se amplificó mediante pases consecutivos en células HeLa y se tituló por el método de plaqueo con agar en células HeLa. Estas técnicas fueron descritas con detalle anteriormente por el Dr. Castrillo (Castrillo, 1986).

- **Virus de la encefalomiocarditis (Encephalomyocarditis Virus - EMCV):** Familia *Picornaviridae*, género *Cardiovirus*. Este virus se amplificó mediante pases consecutivos en células BHK y se tituló por el método de plaqueo con agar en células BHK.
- **Virus de la fiebre aftosa (Foot-and-Mouth Disease Virus - FMDV):** Familia *Picornaviridae*, género *Aftovirus*. Este virus fue cedido amablemente por la Dra. Encarnación Martínez-Salas (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”). Se empleó la cepa C-S8 descrita previamente por J. Díez (Díez et al., 1990).
- **Virus de la vacuna (Vaccinia Virus - VV):** Familia *Poxviridae*.
- **Virus de la Influenza (Influenza Virus - FLU):** Familia *Orthomyxoviridae*. Se empleó la cepa A/Victoria/3/75 (H3N2)¹ (VIC) que fue cedida amablemente por Amelia Nieto (Centro Nacional de Biotecnología).

3.2 Manipulación de ácidos nucleicos

3.2.1 Separación electroforética de DNA y RNA en geles de agarosa

La separación del DNA y RNA se llevó a cabo en geles de agarosa del 0.8 al 1.6% (p/v), dependiendo del tamaño de los productos analizados. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga para ácidos nucleicos (azul de bromofenol al 0,25%, xilén cianol al 0,25% y ficoll al 15%). El electrolito empleado para la electroforesis fue TAE 1X (Tris base 2M, ácido acético glacial 5,7% y EDTA 0,05M (pH 8) (TAE 50X)). Tras la separación electroforética del DNA/RNA se procedió a la tinción de éste con bromuro de etidio (5 mg/ml), para posteriormente visualizar las bandas de ácidos nucleicos en un transiluminador con luz ultravioleta. Las muestras de RNA fueron analizadas después de inactivar las RNasas presentes en los materiales tratando los soportes de electroforesis con H₂O₂ y etanol y autoclavando las soluciones empleadas.

3.2.2 Plásmidos

Plásmidos derivados de pTM1.

- **pTM1:** Este plásmido contiene el promotor para la RNA polimerasa del bacteriófago T7 seguido por el IRES del EMCV y la secuencia del gen a expresar. De este modo, los RNAs producidos por la T7 RNA pol pueden traducirse por traducción interna y, por tanto, de forma independiente de cap debido a la presencia del IRES del EMCV. Por otro lado este plásmido

puede ser utilizado en una reacción de transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa del fago T7 purificada (*Promega*).

- **pTM1-2A.** Este plásmido posee el gen 2A de poliovirus tras el IRES del EMCV (Aldabe, 1995; Aldabe et al., 1995a) y fue utilizado como molde para la transcripción del mRNA IRES-2A.

- **pTM1-Luc.** Contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (Alvarez, 2004). La transcripción *in vitro* de este plásmido da lugar al mRNA EMC-IRES-Luc .

Plásmidos derivados de pKSBluescript.

- **pKS.** (*Stratagene*) contiene el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, pero difiere de pTM1 en que este no va seguido de la secuencia IRES de EMCV. Al igual que en el caso del pTM1, se requiere el aporte en *trans* de la polimerasa de T7 para conseguir expresión de genes heterólogos a partir de este plásmido en células de mamífero. Se utilizó para sintetizar *in vitro* mRNAs capeados y analizar después su traducción en células transfectadas tratadas o no con compuestos que inducen fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2.

- **pKS-Luc.** Codifica para el gen de la luciferasa (*Photinus pyralis*) (Barco, Feduchi, and Carrasco, 2000).

Otros plásmidos

- **Mengo – Luc** - Este plásmido fue cedido amablemente por la Dra. Palmenberg (University of Wisconsin, Madison, WI, USA) (Fata-Hartley and Palmenberg, 2005). La transcripción *in vitro* de este plásmido genera un replicón del virus Mengo que contiene como gen reportero la luciferasa.

- **pRLuc-31** – Este plásmido fue cedido generosamente por el Dr. Kusov (Institute of Medical Molecular Biology, Universidad de Lubeck, Alemania) y codifica un replicón del virus de la polio con un gen de luciferasa (Andino et al., 1993).

- **T7 RLuc ΔEMCV IGR FLuc** – Este plásmido fue donado amablemente por el Dr. (Wilson et al., 2000b) y permite la síntesis *in vitro* de mRNAs que portan la secuencia IGR del virus de la parálisis del grillo (CrPV) delante del gen de la luciferasa.

3.2.3 Extracción de RNA y RT-PCR a tiempo real

El aislamiento del RNA se realizó usando el kit comercial RNAeasy (*Quiagen*), según las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA total purificado se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*).

Para analizar la cantidad relativa del RNA de la proteína P del VSV se realizó una RT-PCR a tiempo real usando sondas TaqMan (*Applied Biosystems*) a partir del RNA total procedente de $2,5 \times 10^5$ células, que fueron recogidas a las 8hpi tal y como se describió previamente. Como control se empleó rRNA 18S y se midió usando el kit Hs 99999901-m1 (*Applied Biosystems*) (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006). La RT-PCR a tiempo real fue realizada según el protocolo descrito anteriormente (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006) El análisis de los datos fue llevado a cabo usando el programa informático SDS-7000 (version 1.1), normalizando los resultados en función de la cantidad del rRNA 18S. Las figuras correspondientes a estos ensayos se muestran con intervalos de confianza del 95%, obtenidos a partir del análisis de dos o tres experimentos independientes.

3.2.4 siRNAs

Los nombres, secuencias y mRNAs diana de los RNAs de interferencia (*Gene Link*, *Dharmacon*) empleados en esta tesis doctoral se pueden observar en la Tabla X.

<i>Nombre</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Diana</i>	<i>Secuencia</i>
si4GI – 31	Gene Link	eIF4GI	CCCATACTGGAAGTAGAAG
si4GI – 3	Gene Link	eIF4GI	GAGCGAAGCTGCTGCAGAA
si4GII – 2	Gene Link	eIF4GII	CACTGAGGCTGAGCGAAAT
sip97 – 2	Gene Link	NAT1/p97/DAP5	TGATCACGTTGATCTACAA
si4E	Gene Link	eIF4E	TACATTAATCGGTAGCAGGAA
siEIF2alpha	Dharmacon	eIF2alpha	
siControl	Gene Link	Negativo	- (fusionado a fluoresceína)

Tabla 1. Los siRNAs utilizados durante el trabajo. En la tabla se presenta los nombres, proveedor, la diana y la secuencia de los siRNAs.

3.2.5 Transcripción *in vitro*

Las reacciones de transcripción *in vitro* se llevaron a cabo empleando tampón de transcripción, DTT y la RNA polimerasa del fago T7 recombinante (*Promega*) siguiendo el

protocolo del fabricante (Madan, 2005). Para introducir la estructura *cap* en los mRNAs se añadió a la mezcla de transcripción el análogo del *cap* $m^7G(5')ppp(5')G$ (0.25 μM) (*Bio labs*) y se redujo la concentración de rGTP a 0,25 μM . Por último la integridad del RNA se analizó visualizándolo con luz ultravioleta en geles de agarosa y la concentración del mismo se determinó usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*).

3.3 Manipulación de proteínas

3.3.1 Valoración de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en una muestra dado se utilizó un *kit* comercial (*Bio Rad*) basado en el método de Bradford de cuantificación de proteínas.

3.3.2 Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida

El análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se describe en la tesis de los Drs. Castrillo y Rodríguez (Castrillo, 1986; Rodríguez, 1994). El porcentaje de acrilamida varió en función de las proteínas a estudio: 7,5-10% para detectar proteínas de alto peso molecular, 15% para analizar la traducción por autorradiografía y para detectar proteínas de peso molecular intermedio; y 17% para hacer lo propio con proteínas de bajo peso molecular (Alvarez, 2004).

3.3.3 Fluorografía y autorradiografía

Para analizar las proteínas sintetizadas mediante fluorografía/autorradiografía primero se incubaron los geles en una solución fijadora (etanol al 20% (v/v) y ácido acético al 7.5% (v/v)) durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada, y después se sumergieron en una solución de salicilato sódico 1M durante 45 minutos. Los geles se secaron al vacío y se expusieron películas fotográficas. El análisis cuantitativo de las bandas individualizadas de proteína se realizó utilizando el densitómetro GS-710 (*Bio Rad*) y el programa *Quantity One* (*Bio Rad*).

3.3.4 Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad*) en tampón de transferencia [(Tris-HCl 25mM (pH 8,3), glicina 190 mM, metanol al 20% y SDS al 0,1%)] durante 15 horas tal y como se describió previamente (Harlow, 1988). El *western blot* fue realizado siguiendo el protocolo detallado por el Dr. Álvarez en su tesis doctoral (Alvarez, 2004). El revelado se realizó usando el kit comercial ECL (*Amersham Biosciences*) y Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (*Thermo Scientific*) según las instrucciones de los fabricantes. El análisis de la cantidad de cada proteína en los distintos experimentos se realizó mediante la densitometría de la película fotográfica en el densitómetro GS-710 (*Bio Rad*). La representación los datos en gráficas se realizó con resultados obtenidos de, al menos, tres experimentos y las barras de error representan la D.E.

La reutilización de la membrana de nitrocelulosa para el uso de otro anticuerpo (*stripping*) se realizó tal y como se describió previamente (Madan, 2005).

3.3.5 Sueros y anticuerpos

Los anticuerpos y sueros utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- **Anti-eIF4GI**: anticuerpos policlonales frente al factor de iniciación de la traducción (eIF) 4GI. Fueron obtenidos tras la inmunización de conejos con péptidos sintéticos derivados de la región N-t o C-t del eIF4GI humano (Aldabe et al., 1995b; Novoa, 1996). Generalmente se empleó una mezcla de los dos anticuerpos (1:2000). En inmunofluorescencia se emplearon por separado en una dilución 1:1000.

- **Anti-fosfoeIF4GI (Ser 1108)**: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce eIF4GI únicamente cuando se encuentra fosforilado en posición 1108. Este anticuerpo fue proporcionado por *cell signaling* y fue empleado en *western blotting* a una dilución 1:1000.

- **Anti-eIF4GII**: anticuerpos policlonales obtenidos frente a la región N-t y C-t del eIF4GII. Fueron amablemente cedidos por el Dr. Sonenberg (Mc Hill University, Montreal) (Gradi et al., 1998a; Gradi et al., 1998b). Se emplearon a una dilución 1:1000 para *western blot* y 1:500 para inmunofluorescencia.

- **Anti-eIF4E**: anticuerpo monoclonal frente al factor de iniciación de la traducción 4E. Proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology*. Se empleó en *western blot* a una dilución 1:250 y en inmunofluorescencia a 1:50.

- **Anti-eIF3**: anticuerpo policlonal de cabra frente al complejo eIF3. Fue cedido amablemente por el Dr. Hershey (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Davis) y usado en *western blot* a una dilución 1:1000.

- **Anti-eIF3, subunidad p100**: anticuerpo policlonal de cabra frente a la proteína p100 del complejo eIF3. Fue proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology* y empleado a una dilución 1:250 para *western blot* y 1:50 para inmunofluorescencia.

- **Anti-p97**: anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína NAT1/p97/DAP-5/, miembro de la familia eIF4G. Este anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. Preiss (Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney). Se utilizó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-eIF2alpha**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína eIF2, subunidad alpha. Proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology* y utilizado a una dilución 1:1000 para *western blot* y 1:100 para inmunofluorescencia.

- **Anti-phosphoeIF2alpha**: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce eIF2alpha únicamente cuando esta fosforilado en la Ser51. Este anticuerpo fue proporcionado por *Cell Signalling* y fue empleado en *western blot* a una dilución 1:1000.

- **Anti-PABP**: anticuerpo monoclonal frente a PABP proporcionado por *Abcam*. Se empleó para *western blot* a una dilución 1:250 y 1:50 para inmunofluorescencia.

- **Anti-CBP80**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína CBP80. Amablemente cedido por la Dra. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen). Se usó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-Ref-1**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína Ref-1 (Aly). Amablemente cedido por la Dra. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen). Se empleó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-PTB**: anticuerpo monoclonal producido frente al extremo C-t de PTB-1 (*Sigma*). Usado en dilución 1:1000 para *western blot*.

- **Anti- α -Tubulina**: anticuerpo monoclonal realizado frente a α -Tubulina. Suministrado por *Sigma*. Se empleó en una dilución 1:5000 para *western blot* y 1:1000 para inmunofluorescencia.

- **Anti-P**: anticuerpo monoclonal del ratón realizado frente a la proteína P del ribosoma. Fue cedido amablemente por el Dr. Garcia-Ballesta (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid, España). Se empleó en una dilución 1:10 para inmunofluorescencia.

- **Anti-VSV G**: anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína G del VSV (*Abcam*). Se utilizó en inmunofluorescencia a una dilución 1:1000.

- **Anti-VSV M**: anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína M del VSV. Amablemente cedido por el Dr. Lyles (Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA). Se utilizó en inmunofluorescencia a una dilución 1:800.

- **Anti-VSV L**: anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína L del VSV. Este anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. Perrault (San Diego State University, CA, USA). Fue empleado en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

- **Anti-EMCV 3D:** anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína 3D del EMCV. Amablemente cedido por la Dra. Palmenberg (University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Se utilizó en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

- **Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa:** estos anticuerpos fueron empleados como anticuerpos secundarios en *western blot*. El anti-IgG de conejo (*Pierce*) fue empleado a una dilución 1:10.000; el anti-IgG de ratón (*Promega*) a 1:5000 y el anti-IgG de cabra (*Santa Cruz Biotechnology*) a 1:5000.

- **Anti-rabbit Alexa 488 (*Invitrogen*):** anticuerpo policlonal realizado frente a anticuerpo de conejo conjugado al fluoróforo *Alexa 488* (verde). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-rabbit Alexa 555 (*Invitrogen*):** anticuerpo policlonal conjugado al fluoróforo *Alexa 555* (rojo). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-mouse Alexa 488 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoróforo *Alexa 488* (verde). Reconoce anticuerpos primarios de ratón. Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-mouse Alexa 555 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoróforo *Alexa 555* (rojo). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-goat Alexa 594 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoróforo *Alexa 594* (rojo). Reconoce anticuerpos primarios producidos en cabra. Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

3.3.6 Medida de la actividad luciferasa

Las células se levantaron con tripsina y se centrifugaron 3 minutos a 2000 rpm. Luego se lavaron con PBS y se lisaron con el tampón de lisis [(Gliciglicina 25mM (pH 7.8), DTT 1mM y Triton – X100 0.55% (v/v)]. Posteriormente se midió actividad luciferasa (de *Photinus pyralis*) empleando el kit comercial *Luciferase Assay System* (*Promega*) y 20 µl de la muestra en el luminómetro *Monolight 2010* (*Molecular Dynamic*). La representación de las mediciones de actividad luciferasa en gráficas se realizó tomando 3 mediciones independientes de, al menos, dos experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar (D.E) obtenida.

Resultados

4.1 Papel de eIF4G en las células infectadas por el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la gripe o el virus vaccinia.

En muchas ocasiones los virus citolíticos alteran la actividad de ciertos factores de iniciación de la traducción del huésped para maximizar la traducción de sus propios mRNAs. Nuestro primer objetivo se centró en analizar el papel del factor eucariótico de iniciación 4G (eIF4G) en la traducción de los mRNAs del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus vaccinia (VV) en células HeLa. Estos dos modelos, VSV y VV fueron elegidos debido a que i) ambos son virus cuyos mRNAs contienen estructura cap y, por tanto, deberían depender de eIF4G y ii) estudios previos han indicado que los mRNAs de estos dos virus podrían ser traducidos por un mecanismo no canónico. El virus de la gripe fue elegido como un virus RNA que replica en núcleo celular y cuyo mRNAs poseen estructura cap y cola de poli(A). Como abordaje experimental utilizamos dos estrategias diferentes pero complementarias: la hidrólisis de eIF4G por expresión de la proteasa 2A del virus de la polio y el silenciamiento de eIF4G usando RNA interferente (siRNA).

4.1.1 Supresión de la actividad de eIF4G en la síntesis de proteínas celulares.

Uno de los principales objetivos de nuestro laboratorio en los últimos años ha sido determinar el papel funcional de eIF4G en la traducción de los mRNAs celulares y virales (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006) y para ello, se han desarrollado un método para hidrolizar eIF4GI y eIF4GII de manera diferencial (Castello, 2008; Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006). Este método se basa en la electroporación de un mRNA transcrito *in vitro* que contiene el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), seguido de la secuencia de la proteasa 2A del virus de la polio (2A^{pro}), y al que me referiré en esta tesis doctoral como el mRNA “IRES-2A”.

Los virus utilizados en este trabajo se escogieron en base a diferentes peculiaridades en su ciclo infectivo: el VSV induce la defosforilación de eIF4E y la activación de 4E-BPs, lo que sugiere que la traducción de su mRNA es independiente del reconocimiento de la estructura “cap” por la maquinaria celular canónica (Colina et al., 2008; Connor and Lyles, 2002). En contraste, la infección por VV induce la activación y relocalización de eIF4E a las factorías virales (Katsafanas and Moss, 2007), así como la desactivación y degradación de 4E-BPs, lo que sugiere que el reconocimiento del “cap” es necesario para la traducción de sus mRNAs (Walsh et al., 2008). Sin embargo, el papel del eIF4G en la infección de VV es hoy en día controvertido, ya que artículos publicados en los años 90 por otros investigadores (Mulder et al.,

1998) y por nuestro grupo (Aldabe et al., 1995a), mostraron resultados opuestos acerca del impacto del corte de eIF4GI en la traducción de los mRNAs de VV. De la misma manera, la infección por virus de la gripe (FLU) induce una defosforilación gradual de eIF4E y una fosforilación moderada de eIF4G que fue asociado con una inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Feigenblum and Schneider, 1993), aunque el papel de estas modificaciones post-transcripcionales es todavía incierto (Walsh). También se ha observado que eIF4E no es necesario para la síntesis de proteínas de FLU (Yanguéz et al., 2011).

4.1.1.1 Impacto del corte del eIF4G en la síntesis de proteínas celulares

Por el método explicado anteriormente, la expresión de 2A^{pro} es “controlada” y se produce rápidamente, dando lugar a la hidrólisis de una o las dos formas de eIF4G (eIF4GI y eIF4GII) en tan sólo 2 horas (Castello et al., 2006). El corte de eIF4G catalizado por PV 2A^{pro} inhibe eficientemente la traducción de mRNAs celulares dependiente del “cap” y poli (A) y en consecuencia, reduce la síntesis de proteínas en curso de manera dependiente de dosis (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006; Lloyd, 2006) (Figura 10, líneas 5 y 11). Sin embargo, la expresión en esos niveles de otras proteínas virales como 3D (Figura 10, carriles 6 y 12) o 2C (dato no mostrado) no produjo ningún efecto citotóxico, inhibición de síntesis de proteínas o corte de eIF4G (Figura 10A y B, carriles 6 y 12).

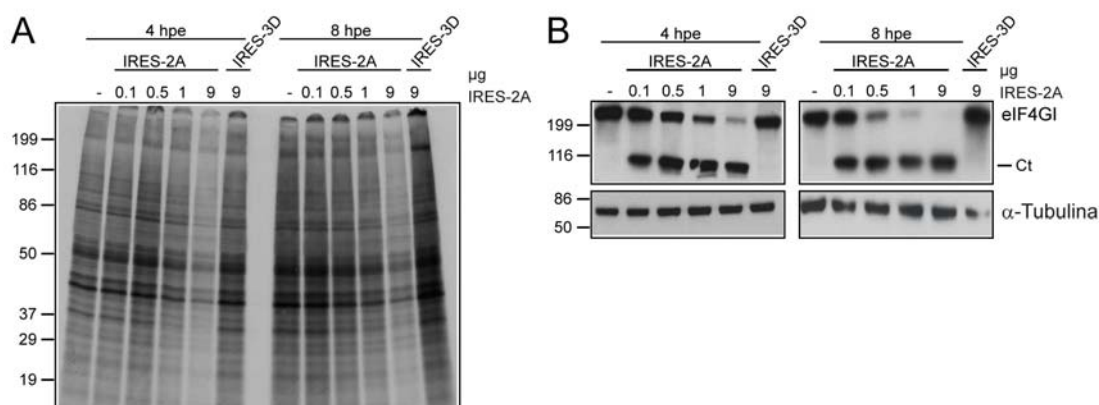


Figura 10. Efectos de la expresión de 2A^{pro} en la síntesis de proteínas celulares. Las células HeLa fueron electroporadas con 0,1, 0,5, 1 ó 9 µg IRES-2A, 9 µg IRES-3D o tampón de transcripción (controles). De 3-4 o 7-8 hpe, las células se incubaron con [³⁵S] Met/Cys. (A) Los lisados celulares fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS seguido por fluorografía y autorradiografía. (B) eIF4GI (panel superior) y α-tubulina (panel inferior) se analizaron por Western blot.

La inhibición de la síntesis global de proteínas no fue consecuencia de una reducción en la cantidad de mRNA celular debido a la expresión de PV 2A^{pro}, ya que los niveles de los mRNAs analizados (ej.: β-actina) permanecen constantes o en ciertos casos (ej.: mRNAs involucrados

en la respuesta inmunológica) incrementan en respuesta a la expresión de 2A^{pro} (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006; Castello et al., 2009a).

4.1.1.2 Silenciamiento del factor de iniciación de la traducción eIF4G en células HeLa: efectos sobre la síntesis de proteínas celulares.

Como se ha descrito anteriormente cuando eIF4GI y eIF4GII son hidrolizados por PV 2A^{pro} se inhibe diferencialmente la traducción de los mRNAs pre-existentes y sintetizados *de novo* (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006). Debido a que PV 2A^{pro} puede hidrolizar también otros factores celulares (ej. Nup98) lo que podría generar algunos efectos adversos en otras funciones celulares, quisimos analizar la repercusión de la carencia funcional de los miembros de la familia eIF4G (eIF4GI, eIF4GII y p97) por medio de su silenciamiento usando siRNAs.

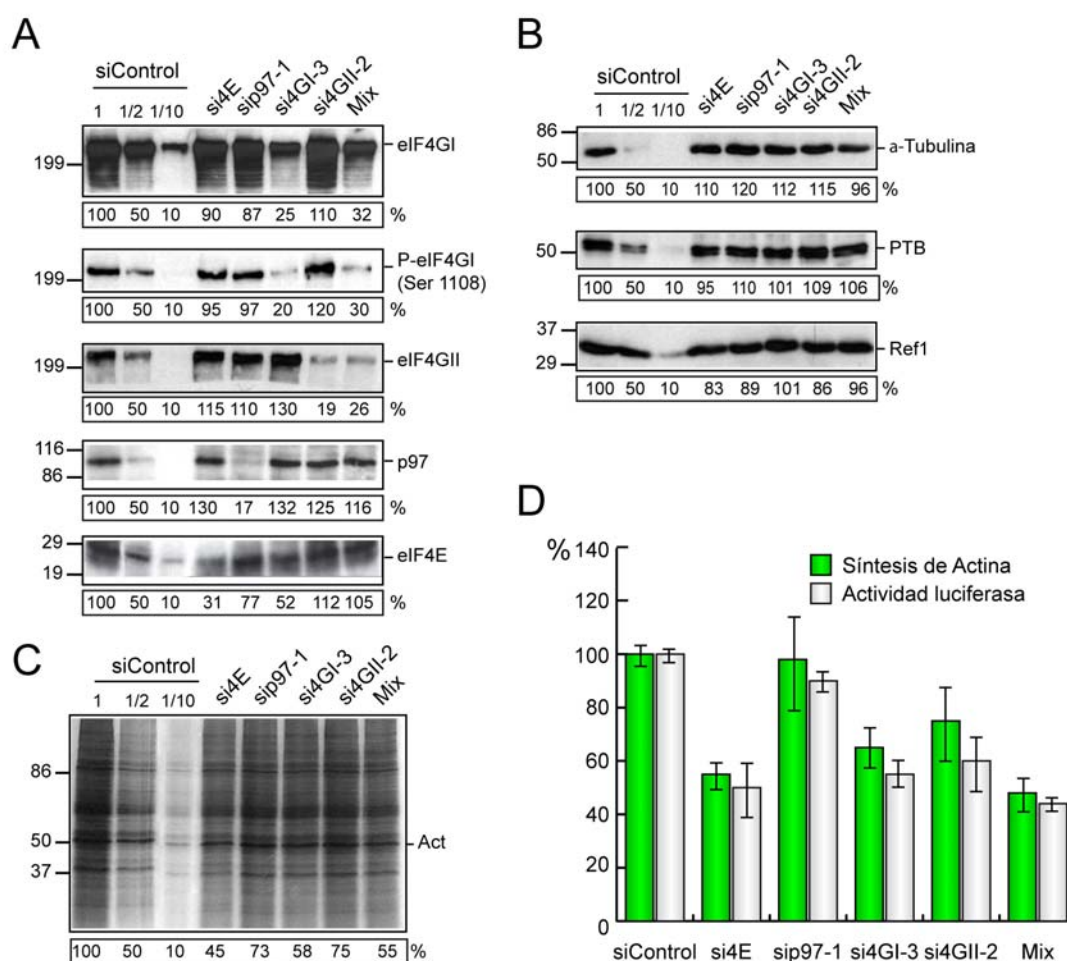


Figura 11. Impacto del silenciamiento de eIF4GI, eIF4GII y p97 en la síntesis de proteínas en las células HeLa. Células HeLa X1/5 fueron transfectadas dos veces (0 y 24 horas) con siControl, si4E, sip97-1, si4GI 3, si4GII 2-o una mezcla (relación 1:1) de si4GI-3 y si4GII-2. A las 48 horas después de la transfección, las proteínas fueron marcadas con [35S] -Met/Cys durante 1 hora y luego se recogieron las células en tampón de muestra. A) La actividad de siRNA se analizó por Western blot con anticuerpos frente a eIF4GI, eIF4GI fosforilado en la Ser1108, eIF4GII, p97 y eIF4E. B) Como control, se midieron por Western blot los niveles de α-tubulina, PTB o Ref-1/Aly. C). La síntesis de proteínas se analizó por autorradiografía y fluorografía. D) La actividad luciferasa se midió en en paralelo después de

8 horas de inducción. Porcentaje de las unidades relativas de luz obtenida a partir de tres experimentos independientes con cada uno de siRNA. Además, se representó el % de la síntesis de actina, medida por densitometría de la banda correspondiente de siete experimentos independientes.

Con este fin, se diseñaron y testaron tres siRNAs para cada uno de estos factores de iniciación (Tabla 1, Materiales y Métodos). Además, los siRNAs descritos anteriormente contra mRNAs que codifican para eIF4E y eIF4GI (si4E y si4GI31, respectivamente, Tabla 1, Materiales y Métodos) también fueron utilizados (Coldwell and Morley, 2006; Svitkin et al., 2005). Se seleccionaron aquellos siRNAs con mayor actividad para silenciar sus mRNA dianas tal y como se describió en la tesis doctoral del Dr. Alfredo Castello (Castello, 2008), y estos siRNAs (si4GI-3 y si4GII-2) fueron empleados en esta tesis doctoral.

El experimento se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, las células HeLa se transfectaron con siRNAs 48 y 24 horas antes de la recogida de las muestras. Para estos experimentos utilizamos las células HeLa X1/5. Estas células poseen integrado en su genoma el gen de la luciferasa (Luc) bajo el control transcripcional de un promotor reprimible por tetraciclina (Tet) (Gossen and Bujard, 1992; Novoa, 1996). Cuando la Tet está presente en el medio no se produce la síntesis del mRNA de Luc. Sin embargo, cuando se retira el antibiótico se produce una paulatina activación de la transcripción del gen *luc*.

La transfección con los siRNAs seleccionados en células HeLa X1/5 conllevó una disminución sustancial y específica de los factores diana (Figura 11A). En paralelo, analizamos la síntesis de proteínas celulares y la actividad de luciferasa, que fue inducida tras la eliminación de la tetraciclina en el medio de cultivo. El si4E indujo una reducción significativa en la cantidad de eIF4E (~ 70%), sin afectar los niveles de otros factores de iniciación, proteínas del citoesqueleto (α -tubulina) o reguladores celulares que participan en otras etapas de la expresión génica, como PTB y Ref-1 (Figura 11A y B). En estas condiciones, la síntesis de proteínas y la actividad de la luciferasa disminuyeron en un ~50% (Figura 11C y D). Cuando eIF4GI o eIF4GII fueron silenciados con si4GI-3 y si4GII-2, la traducción de los mRNAs celulares y de luciferasa se redujeron en ~ 40%, revelando que ambas formas de eIF4G contribuyen a la iniciación de la traducción en nuestras condiciones experimentales (Figura 11A, C y D). El silenciamiento simultáneo de eIF4GI y eIF4GII redujo la síntesis de proteínas y la actividad de luciferasa en un 50% (Figura 11A, C y D). El eIF4G se sobre-expresa en líneas celulares y células tumorales y posiblemente, la cantidad de eIF4G no silenciado en estos experimentos (alrededor del 15%) es suficiente para mantener la traducción celular al menos parcialmente. En cambio, el silenciamiento de p97 sólo afecta levemente a la traducción de mRNAs celulares o a los niveles de actividad de luciferasa (Figura 11A, C y D). En contraste con resultados propuestos a finales de los años noventa (Imataka, Olsen, and Sonenberg, 1997), nuestros datos son consistentes con la idea de que la actividad de p97 podría restringirse a condiciones

celulares determinadas, tal y como se ha descrito en los últimos años para situaciones de estrés celular y apoptosis (Hundsdoerfer, Thoma, and Hentze, 2005; Lewis et al., 2008).

Es importante resaltar que la actividad luciferasa procedente de RNAs sintetizados *de novo* se inhibieron en la misma medida que la síntesis de proteínas celulares. Este resultado indica que eIF4G participa en la traducción de los mRNAs sintetizados *de novo* y en los pre-existentes en igual medida, y, por tanto, que el modelo propuesto por Castello y colaboradores en 2006 en el cual se proponía a eIF4GI como factor esencial y no intercambiable por su homólogo eIF4GII en la primera ronda de traducción, era erróneo. Dichos efectos se debían al corte de Nup98 y a la inhibición del tráfico núcleo-citoplasma, según describimos posteriormente (Castello et al., 2009a).

4.1.2 Papel de eIF4G en la síntesis de proteínas de VSV

Tal y como se mencionó anteriormente se eligió el VSV para este primer estudio debido a las peculiaridades de su expresión génica y su presunta independencia de eIF4E a pesar de que produce mRNAs con estructura cap.

4.1.2.1 Efecto del corte proteolítico de eIF4G en la síntesis de proteínas de VSV

En primer lugar se procedió a hidrolizar eIF4G usando la proteasa 2A de PV. En el caso de VSV la electroporación con el mRNA IRES-2A se realizó 2 horas antes de la infección (Figura 12), debido a que este virus desarrolla un ciclo infectivo en el que se expresan siempre las mismas proteínas. De esta forma, los mRNAs virales encuentran eIF4G hidrolizado antes de comenzar la primera ronda de traducción.

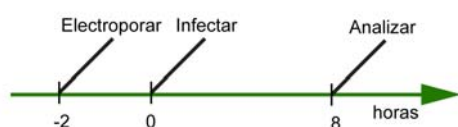


Figura 12. Representación esquemática del experimento. Efecto del corte de eIF4G en la traducción celular: electroporación con el mRNA IRES-2A (tiempo -2), infección con virus (tiempo 0) y recogida de las muestras a las 8 horas después de la infección (tiempo 8).

Tras electroporar el mRNA IRES-2A e infectar con VSV, procedimos al estudio de distintos parámetros indicadores de la eficiencia de infección, tales como los niveles de proteínas celulares y virales y RNA viral. En el primer punto de control (3 hpi) no se pudieron detectar las proteínas del VSV (Figura 13A), sugiriendo un tiempo muy temprano de infección. Como consecuencia de la expresión de 2A y el corte de eIF4G, la síntesis de proteínas celulares (aun detectables) se redujo de manera dependiente de la dosis de mRNA IRES-2A (Figura 13A y B), tal y como ocurrió en el caso de las células no infectadas (Figura 10). Empleando 1 µg de

IRES-2A se indujo una inhibición parcial de la síntesis de proteínas celulares, simultáneo con el corte de eIF4GI (Figura 13A y B, carril 2); en cambio, usando 9 μg de IRES-2A se logró una inhibición casi completa de la traducción celular ($90 \pm 10\%$), que correlaciona con la hidrólisis de las dos formas de eIF4G (I y II) (Figura 13A y B, carril 5). Dos horas más tarde (5 hpi), VSV inhibió la síntesis de proteínas celulares, de modo que solo se pudieron detectar las proteínas virales (Figura 13C, carril 1). La traducción del mRNA viral no se vio afectada por la hidrólisis de eIF4GI (Figura 13C y D, carril 1 frente a 2). De hecho, la síntesis de proteínas de VSV fue tan sólo parcialmente inhibida ($\sim 50\%$) cuando ambos eIF4GI y eIF4GII fueron casi totalmente proteolizados con 5 μg de IRES-2A (Figura 13C y D, carril 4). Puesto que esa cantidad de IRES 2A es suficiente para inhibir profundamente la traducción celular (Figura 10) (Castello, 2008 #6; Castello, 2006 #3} podemos concluir que la traducción de los mRNAs del VSV depende en menor medida de la integridad funcional de eIF4G.

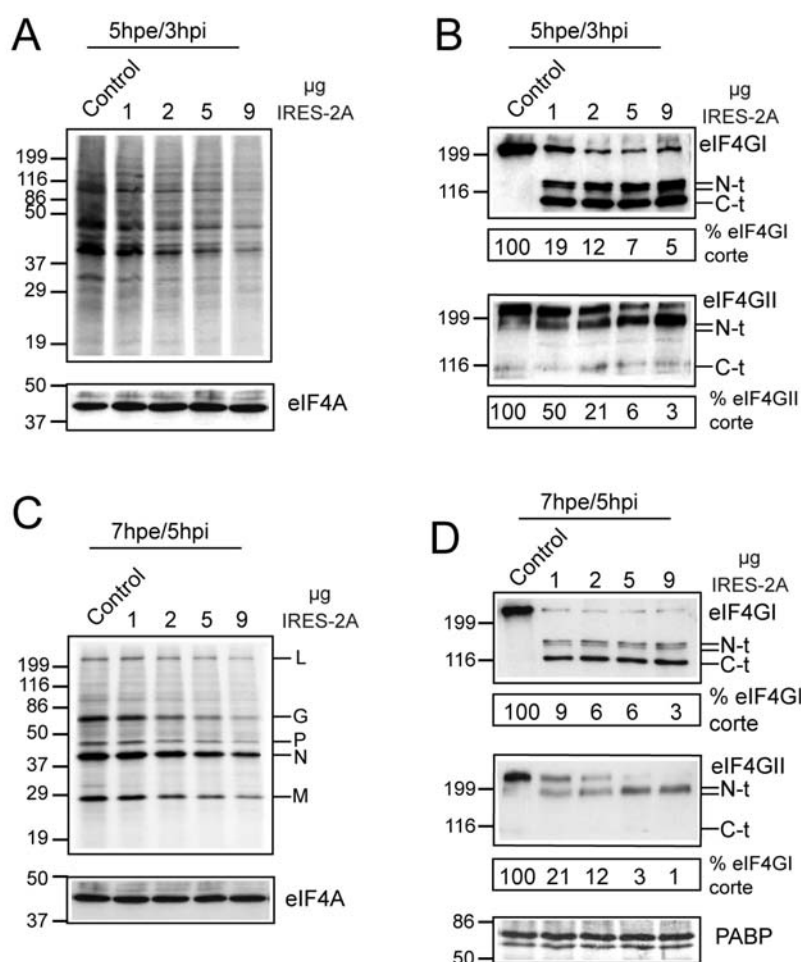


Figura 13. Efecto de la actividad de PV 2A^{pro} sobre la síntesis de proteínas de VSV. Las células HeLa se electroporaron con 0, 1, 2, 5 y 9 μg de mRNA con el IRES-2A. A las 3 hpe, las células electroporadas fueron infectadas con VSV (10 ufp / célula), y a las 2 y 4 hpe, se marcaron durante 1 hora con [³⁵S] Met/Cys y luego se recogieron. (A y C) La síntesis de proteínas fue analizada por fluorografía y autorradiografía. eIF4A se analizó por Western blot (paneles inferiores) como control de carga. (B y D) análisis del Western blot de eIF4GI (panel superior) o eIF4GII (panel inferior). El porcentaje del corte de eIF4G se midió mediante el escaneo de la banda intacta de eIF4G (D) PABP También fue detectado por Western blot (panel inferior).

Para determinar si la expresión de PV 2A^{pro} podría afectar a la replicación de VSV, se realizó RT-PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman diseñada contra el mRNA del VSV que codifica la proteína P. Mediante este análisis se observó una pequeña reducción en el nivel de mRNA P de VSV en las células electroporadas con 1 µg de mRNA de IRES-2A (~ 20%) (Figura 14A), mientras que con la dosis más alta de IRES-2A (9 µg), disminuyó en un 70%. Por lo tanto, PV 2A^{pro} tiene un efecto adverso sobre la replicación y/o transcripción de VSV. Teniendo en cuenta los niveles de la proteína P sintetizada en la figura 13C y la cantidad de su mRNA en las células electroporadas con IRES-2A, la síntesis de proteínas de VSV sería solo ligeramente afectada por la hidrólisis de eIF4G (Figura 14C). Por lo tanto, la traducción de mRNA de VSV puede ocurrir en las células infectadas por un mecanismo no-canónico, ya que se produce cuando la maquinaria canónica de iniciación de la traducción cap- y poli (A)-dependiente es inactivada por la hidrólisis de eIF4G.

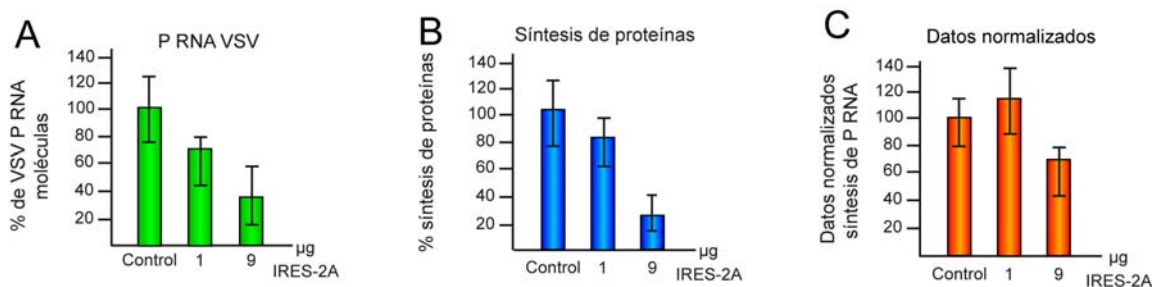


Figura 14. Efecto de la actividad de la proteasa 2A del PV sobre la expresión génica de VSV. Las células HeLa se electroporaron con 0, 1, 2, 5 y 9 µg de mRNA con el IRES-2A. A las 3 hpe, las células electroporadas fueron infectadas con VSV (10 ufp / célula), y a las 2 y 4 hpe, se marcaron durante 1 hora con 7 Ci [³⁵S] Met/Cys y luego se recogieron. A) Steady-state Niveles del VSV P RNA a partir de células transfectadas con diferentes dosis de IRES-2A e infectadas con VSV, a las 8 hpi. Los porcentajes de los datos obtenidos a partir de dos medidas diferentes. B) Porcentaje de la síntesis de la proteína P de VSV a las 8 hpi en las células transfectadas. SD se obtuvo a partir de tres experimentos independientes. C) La representación de la traducción del mRNA de VSV P, normalizada teniendo en cuenta el nivel de mRNA de VSV P y el porcentaje de la síntesis de P en las células transfectadas.

4.1.2.2 Efectos del silenciamiento de factores de iniciación en la síntesis de las proteínas de VSV.

El siguiente objetivo fue determinar el papel que tiene el complejo eIF4F en la síntesis de proteínas de VSV empleando el silenciamiento de eIF4GI y/o eIF4GII por la transfección de siRNA en células HeLa. Como se menciono anteriormente las células HeLa fueron transfectadas con siRNAs dos veces con 24 horas de diferencia. A las 48 horas después de la primera transfección se infectaron las células con VSV (10 pfu/célula). A distintos tiempos de infección se analizó el estado de los factores de la traducción en la infección viral.

Como se describió anteriormente, si4GI-3 indujo una disminución específica de alrededor del 85% en la cantidad de eIF4GI (Figura 15A), mientras que eIF4GII disminuyó hasta límites

casi indetectables (Figura 15A). La transfección simultánea de células HeLa con ambos siRNAs simultáneamente produjo un silenciamiento de $\sim 70\%$ en el caso de eIF4GI y el de $\sim 90\%$ en el de eIF4GII (Figura 15A). El silenciamiento de eIF4GI, eIF4GII o ambas formas indujo una inhibición parcial de la síntesis de proteínas en las células no infectadas (Figura 15C). Estas células fueron posteriormente infectadas con VSV (10 pfu /célula) y la síntesis de proteínas fue analizada a las 6 y 8 horas post-infección (hpi). La traducción de mRNA de VSV fue similar a la encontrada en células transfectadas con los siRNAs específicos o con el siRNA control; aunque se pudo detectar una pequeña reducción en la incorporación de [S35] Met /Cys a tiempos tempranos (Figura 15C).

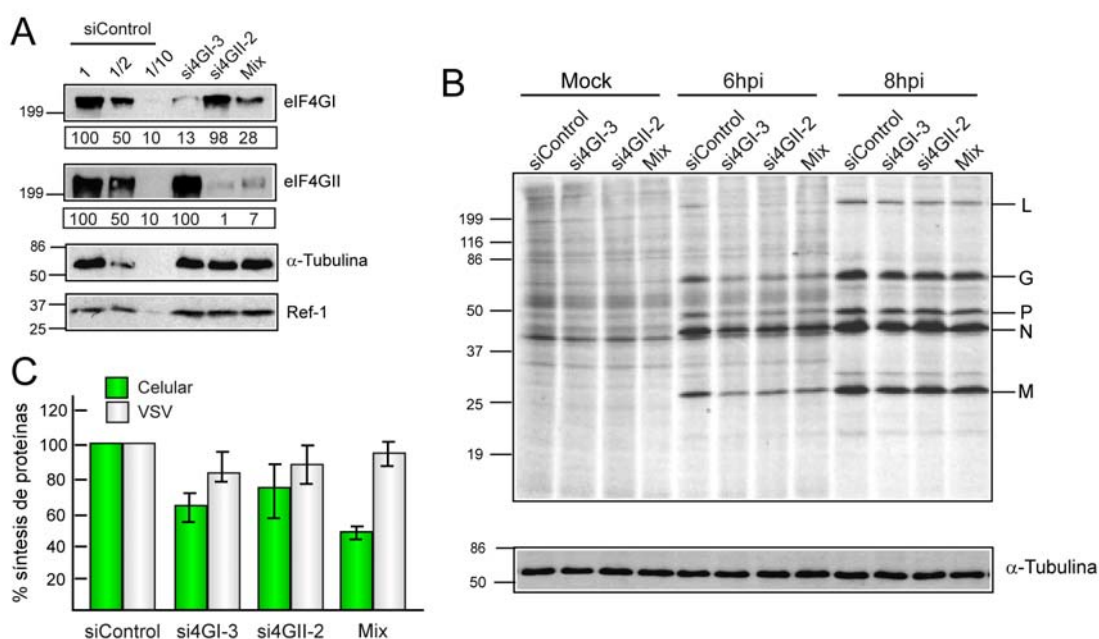


Figura 15: Traducción de los mRNAs de VSV en células HeLa después del silenciamiento de eIF4GI, eIF4GII o ambos. Las células HeLa fueron transfectadas con si4GI-3, si4GII 2-o una mezcla (relación 1:1) de ambos. siControl se utilizó también en paralelo. Se realizaron dos transfecciones en los intervalos de tiempo de 24 horas. A las 48 horas después de la primera transfección, las células HeLa fueron infectadas con VSV (10 ufp / célula) y, a los 0, 5 y 7 hpi, se marcaron durante 1 hora con [35S] -Met/Cys. A) Análisis por Western blot de las células transfectadas con los anticuerpos frente a eIF4GI o eIF4GII, α -tubulina y la proteína Ref-1/Aly. B) Análisis de la síntesis de proteínas por autorradiografía y fluorografía de las células transfectadas y Mock- o infectadas con VSV. C) Porcentaje de la síntesis de proteínas de VSV a las 8 hpi de ocho experimentos independientes.

Para reforzar estas observaciones, se analizó la cantidad y localización de la glicoproteína (G) de VSV a las 8 hpi por microscopía confocal (Figura 16). En las células en las que eIF4GI apenas se detecta por inmunofluorescencia y por tanto está eficientemente silenciado, la glicoproteína G de VSV se observa al mismo nivel que en las células control, en las que eIF4GI está presente (Figura 16). Estos datos ponen de manifiesto una vez más que la síntesis de proteínas de VSV no requiere eIF4G.

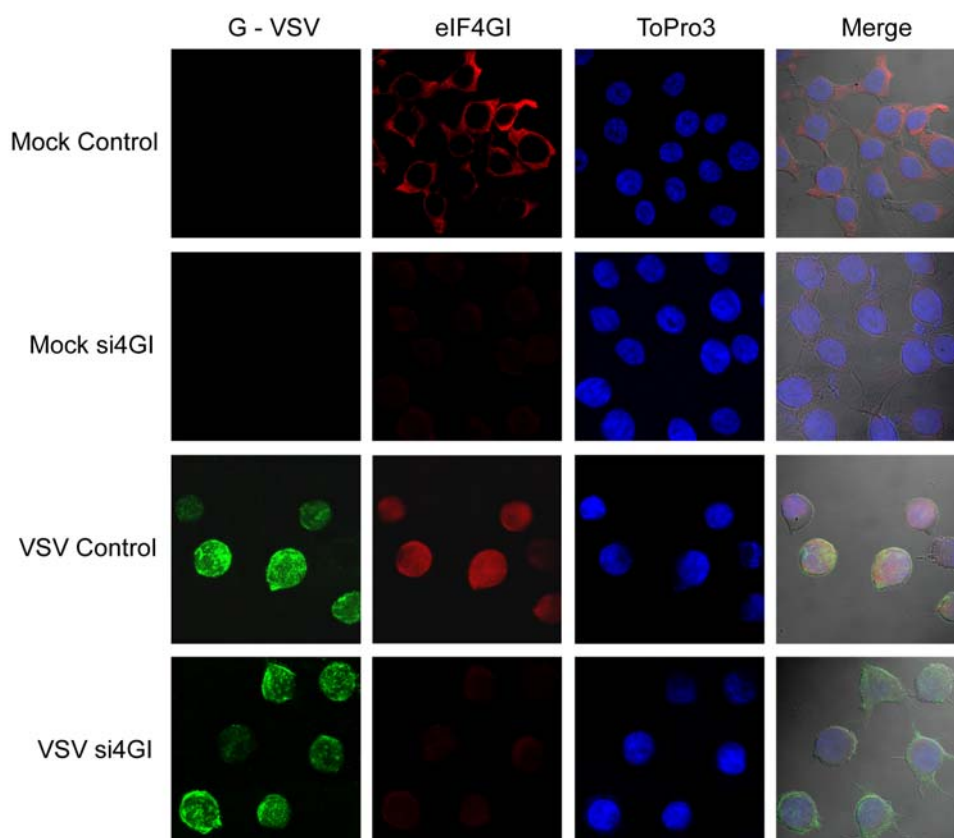


Figura 16: La expresión de la glicoproteína G de VSV en células silenciadas de eIF4GI. El silenciamiento del factor eIF4GI se llevó a cabo con si4GI-3 siRNA en dos pasos separados por 24 horas. A las 48 horas después de la primera transfección, las células HeLa fueron infectadas con VSV (10 ufp / célula) y, a las 8 hpi, fueron permeabilizadas y fijadas. Se detectó eIF4GI y G de VSV por inmunofluorescencia indirecta.

El redondeamiento de las células es un cambio morfológico que se produce como consecuencia de los efectos citopáticos asociados a la infección por un virus citolítico. En células silenciadas de cualquiera de las formas de eIF4G, el VSV indujo el redondeamiento celular con la misma cinética que en las células control (Figura 17), lo que sugiere que la ausencia de eIF4G no afecta a la progresión normal del ciclo infeccioso.

Tal y como se esperaría de un virus que no necesita eIF4G para su ciclo infeccioso, la falta de eIF4E en células HeLa no afectó a la iniciación de la traducción de los mRNAs de VSV, mientras que la síntesis de proteínas en las células control fue substancialmente inhibida en estas condiciones (Figura 18A, carriles 2 vs 5 y 8). Por otro lado el silenciamiento de p97 no indujo ningún efecto sobre la expresión génica celular o de VSV (Figura 18).

Además la ausencia de eIF4E o p97 tampoco produjo ningún efecto aparente en la cinética del efecto citopático inducida por la infección con VSV (Figura 19). En conjunto, estos datos sugieren que eIF4F no es esencial para la iniciación de la traducción de los mRNAs de VSV, a pesar de que éstos poseen estructura cap. Estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo de iniciación de la traducción diferente para los mRNAs de VSV.

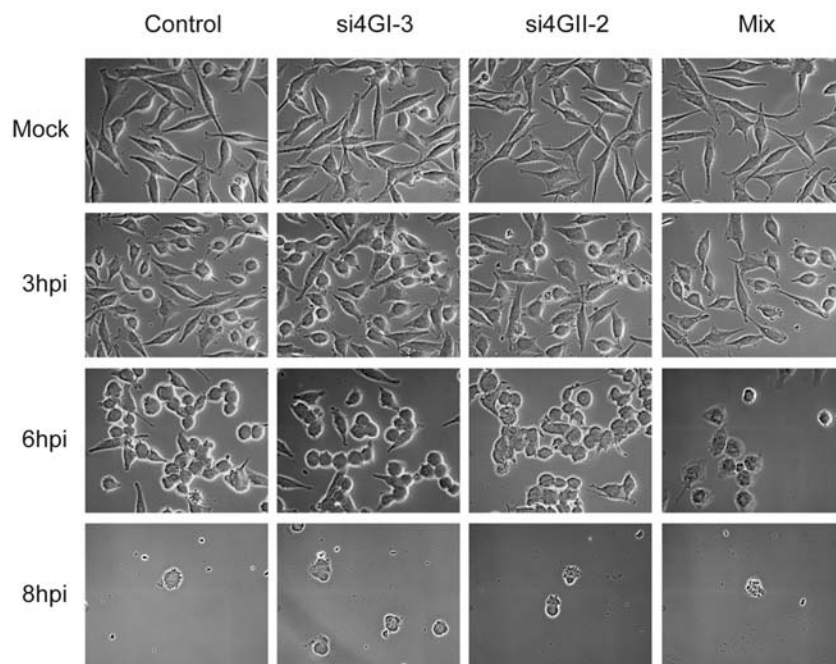


Figura 17: Efecto citopático en células silenciadas de eIF4GI, eIF4GII o ambos e infectadas con VSV. Células HeLa transfectadas con si4GI-3, si4GII-2 y con una mezcla de ambos siRNAs (relación 1:1), de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. A las 48 post transfección, las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio e infectadas con VSV (10 ufp / célula). A las 0, 3, 6 y 8 hpi, las células fueron fijadas y analizadas al microscopio Axioskop vertical (Zeiss) con 63X/1,25 Plan-Neofluar Ph3 objetivo.

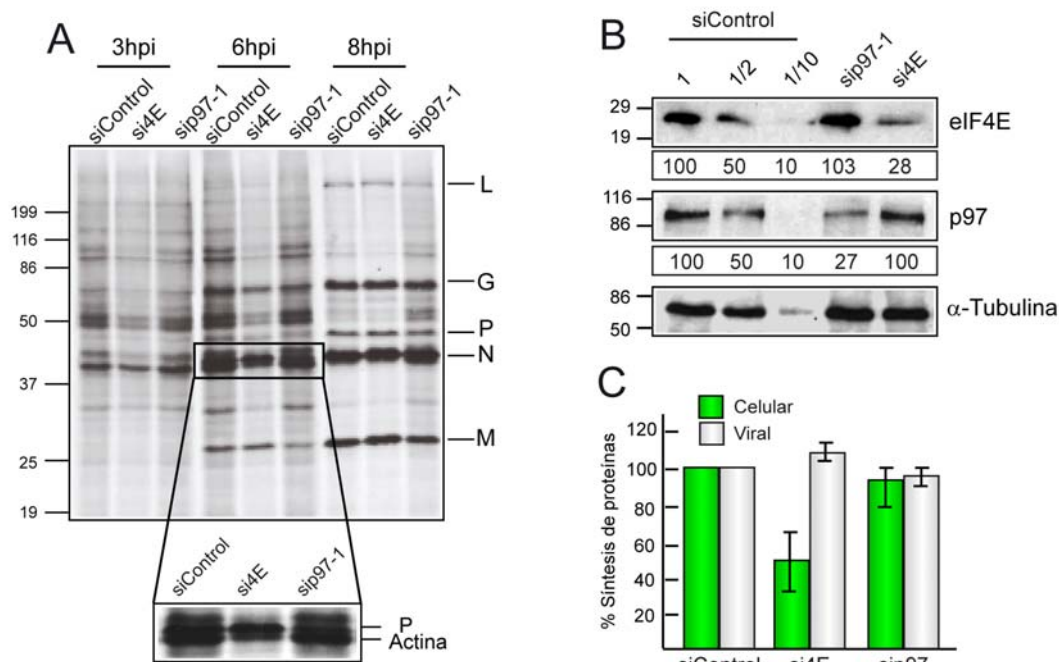


Figura 18. Traducción del mRNA de VSV en las células con silenciamiento de eIF4E o p97. Las células HeLa transfectadas con siRNAs: sip97-1, si4E y siControl de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. A las 48 hpt células HeLa fueron infectadas con VSV (10 ufp / célula) y a las 0, 2, 5 y 7 hpi se incubaron con [³⁵S] -Met/Cys y después de 1 hora fueron recogidas. A) El análisis de la síntesis de proteínas a las 0, 3, 6 y 8 hpi por fluorografía y autorradiografía. B) Western blot frente a eIF4E, p97 y α-tubulina. C) Porcentaje la síntesis de proteínas celulares y de VSV de cinco experimentos diferentes con los interferentes de eIF4E y p97-2.

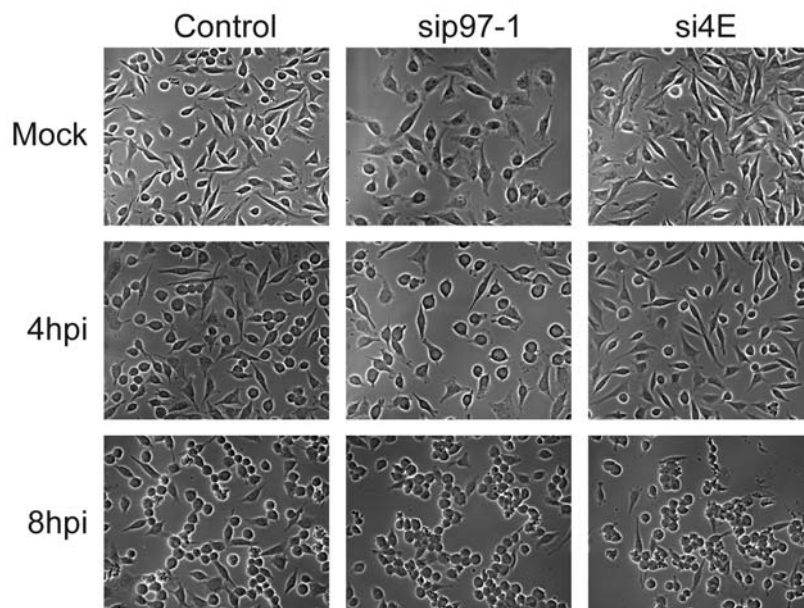


Figura 19. Microscopia de Contraste de fases de las células HeLa infectadas con VSV y transfectadas con siRNAs – sip97 y si4E. Las células transfectadas fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y también infectadas por VSV (10 ufp / célula). A las 0, 4 y 8 hpi, las células fueron fijadas y analizadas al microscopio Axioskop vertical (Zeiss) con 63X/1,25 Plan-Neofluar objetivo de aceite Ph3.

4.1.3 Localización de los factores de la traducción en células infectadas con VSV.

Los complejos de replicación del VSV pueden ser visualizados por microscopia confocal utilizando un anticuerpo contra la proteína L (polimerasa) (Figura 20). La proteína L se encuentra en focos citoplasmáticos ubicados en la zona perinuclear y en las proximidades de los sitios de acumulación de la proteína M en la membrana plasmática celular. Curiosamente, la proteína ribosomal P, que es un buen marcador de la ubicación de los ribosomas (Sanz et al., 2009), se distribuye en focos rodeados por la proteína L.

Estos datos indican que la replicación y transcripción del genoma viral y la traducción de los mRNAs de VSV tienen lugar en un espacio próximo. Además, se determinó la localización de los mRNAs poliadenilados en las células infectadas con VSV mediante hibridación *in situ* con oligo d(T) unido a la fluoresceína.

La localización del oligo d(T) debe corresponder con la distribución de los mRNAs poliadenilados ya que no se detectó fluorescencia cuando se llevó a cabo este protocolo con la sonda de oligo d(A) marcado con fluoresceína (datos no mostrados). Los mRNAs poliadenilados se concentran básicamente en los núcleos de las células infectadas con VSV, mientras que la tinción citoplasmática de oligo d(T) fue inferior a la observada en las células no infectadas. Este resultado es consistente con la inhibición de la exportación del mRNA celular

desde el núcleo al citoplasma realizado por la proteína M de VSV (Her, Lund, and Dahlberg, 1997). Sin embargo, los mRNAs poliadenilados también se observaron pero en menor medida en la proximidad de la proteína L, lo que probablemente indica la presencia del mRNA viral en estas áreas (Figura 20B).

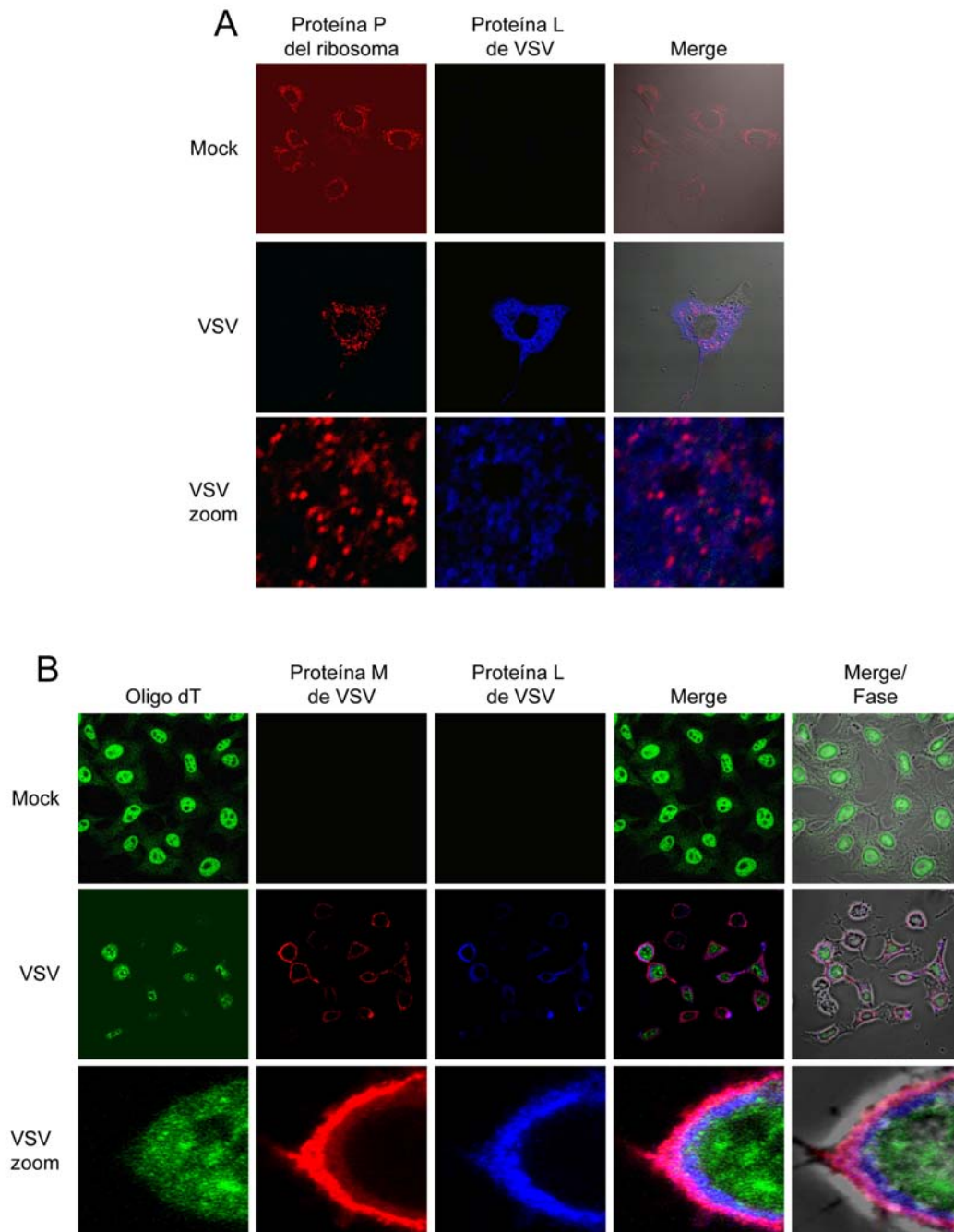


Figura 20. Localización de la proteína L y los ribosomas de las células infectadas con VSV. Las células HeLa fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio e infectadas o no con -10 ufp / célula. A las 7 hpi células fueron fijadas y permeabilizadas. A) La proteína ribosómica P y la proteína L de VSV fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta. B) Hibridación in situ con la sonda con oligo d(T) unido a la fluoresceína y las proteínas L y M fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos. Las células fueron examinadas por microscopía confocal y el contorno celular se definió por microscopía de contraste de fase. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Huygens 3.0.

4.1.3.1 eIF4G en la traducción de los mRNAs del virus de la gripe

Los mRNAs del virus de la gripe y los mRNAs celulares son formalmente equivalentes, dado que ambos contienen estructura cap y cola de poli(A). Por ello, este virus debe poseer mecanismos para promover la traducción selectiva de sus mRNAs. De hecho, este virus altera la maquinaria de traducción y en especial el complejo eIF4F, donde eIF4E y eIF4G son fosforilados durante la infección (Feigenblum and Schneider, 1993). La proteína viral NS1 desempeña un papel importante en la traducción selectiva de los mRNAs virales; especialmente de los mRNAs tardíos, mediante la interacción directa con eIF4G y PABP (Aragon et al., 2000; Burgui et al., 2003). Sin embargo, la traducción selectiva de los mRNAs virales también se observan en virus mutantes en los que ha sido eliminado el gen de NS1. Esto indica que otros factores virales deben participar en la traducción predominante de los mensajeros virales que se lleva a cabo dentro de las células infectadas (Salvatore et al., 2002). La polimerasa del virus de la gripe es un heterotrímero compuesto por tres subunidades (PA, PB1 y PB2), que añade la estructura cap mediante un mecanismo de “cap-snatching”. El reconocimiento traduccional del “cap” parece lograrse mediante la subunidad PB2 que interacciona con eIF4GI (Yanguéz et al., 2011).

4.1.3.2 Papel de eIF4G en la síntesis de proteínas del virus de la gripe

Para analizar si la traducción del mRNA del virus de la gripe podría tener lugar en ausencia de eIF4G intacto, se llevó a cabo un enfoque similar al caso de VSV (Figura 21). Con el fin de evaluar el papel de eIF4G y la contribución específica de eIF4GI y eIF4GII en la traducción del virus de la gripe, se emplearon los siRNAs y el desarrollo experimental descritos anteriormente. Después del silenciamiento de eIF4GI (Figura 22A) pudo ser observada una disminución en la síntesis de proteínas virales del 40-60% desde las 6 hpi (Figura 22B y C). Estos datos sugieren que el factor eIF4G es un requisito importante para una infección por virus de la gripe. Por tanto, aunque FLU y VSV son virus RNA de polaridad negativa, sus requerimientos traduccionales difieren.

4.1.4 Papel de eIF4G en la infección por el virus vaccinia

Teóricamente, eIF4E y eIF4G deben ser requeridos para la traducción de los mRNAs del virus vaccinia (VV), ya que ambos son activados y reclutados a las factorías virales durante la infección (Katsafanas and Moss, 2007; Walsh et al., 2008). Sin embargo, el papel de eIF4G en la infección del VV es incierto, debido a los resultados contradictorios obtenidos con la

expresión de proteasas de picornavirus en células infectadas (Aldabe et al., 1995a; Barco, Feduchi, and Carrasco, 2000; Mulder et al., 1998).

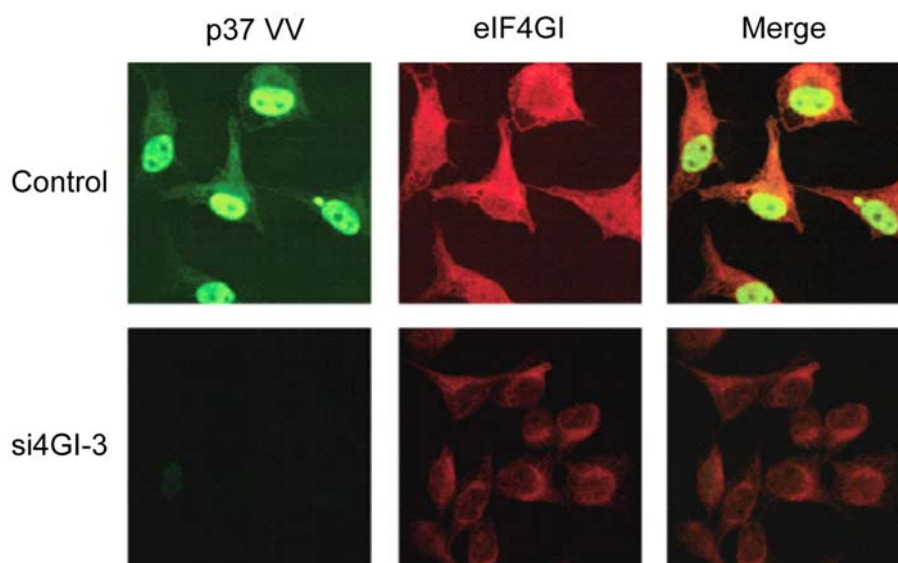


Figura 21. Efecto del silenciamiento de eIF4G en la acumulación de la proteína viral. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y eIF4GI fue silenciado de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Las células HeLa fueron transfectadas con siRNAs específicos para eIF4GI o con siRNA Control y fueron infectadas o no con el virus de la gripe (10 pfu/célula). A las 6 hpi, las células fijadas, permeabilizadas y procesadas para microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a la proteína PB2 de FLU y eIF4GI.

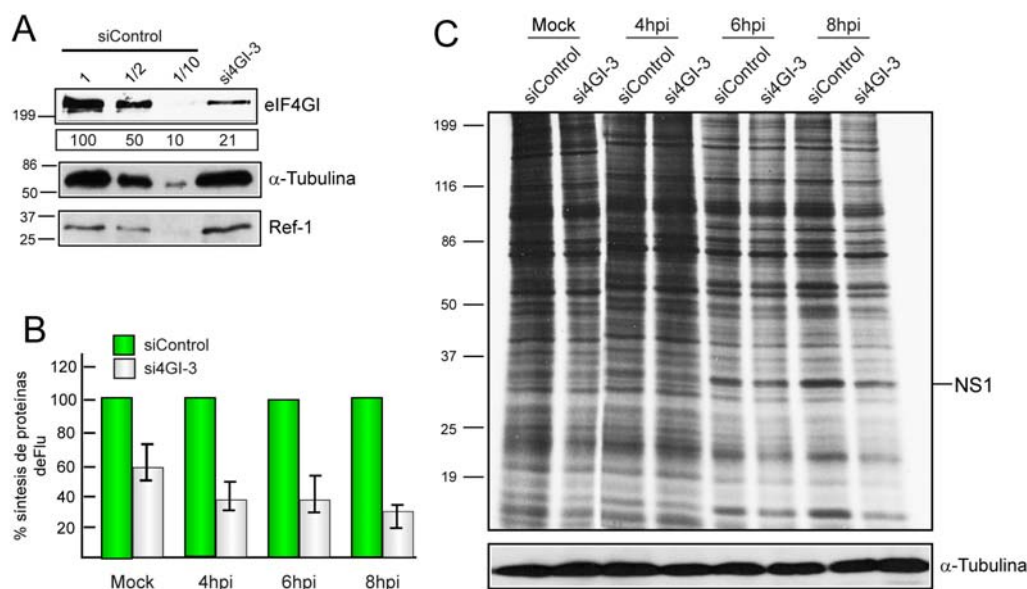


Figura 22. Traducción de mRNAs del virus de la gripe en células HeLa en la ausencia de eIF4GI. Las células HeLa transfectadas con si4GI-3 y siControl de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. A las 48 hpt células HeLa fueron infectadas con FLU (10 pfu / célula) y a las 0, 3, 5 y 7 hpi se incubaron con [35S] -Met/Cys y después de 1 hora fueron recogidas. A) Western blot frente a eIF4GI, Ref-1 y α-tubulina. B) Porcentaje de la síntesis de proteínas de FLU a las distintas horas post infección en las células transfectadas con siControl y si4GI-3. C) El análisis de la síntesis de proteínas a las 0, 4, 6 y 8 hpi por fluorografía y autoradiografía.

4.1.4.1 Efecto de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la síntesis de proteínas de VV

Teniendo en cuenta que nuestro sistema de expresión de 2A^{pro} es más controlable que los empleados en trabajos anteriores, se analizó de nuevo el efecto de la hidrólisis de eIF4G en la síntesis de proteínas de VV. Considerando la complejidad de la expresión génica de VV, se estudiaron dos condiciones diferentes en las células HeLa (Figura 23).

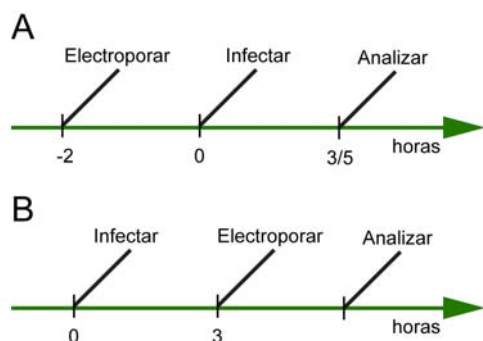


Figura 23. Representación esquemática del experimento. Efecto del corte de eIF4G en la traducción de los mRNAs de VV (A) Se electroporaron las células HeLa (tiempo -2) y se infectaron posteriormente con VV (tiempo 0) y a las 8 horas después se recogieron las células (tiempo 3/5). (B) Las células se infectaron con VV (tiempo 0) y posteriormente se electroporaron con el mRNA (3h), seguido por la análisis a las 8 horas post infección (tiempo 8).

En primer lugar, las células fueron transfectadas con diferentes cantidades de mRNA IRES-2A e infectadas con VV a las 2 hpe (Figura 24A y C, Figura 23A). En segundo lugar (Figura 23B), las células HeLa fueron infectadas con VV y electroporadas con la misma cantidad de mRNA IRES-2A a las 3 hpi (Figura 24B y D).

En resumen, se establecieron dos condiciones experimentales: el eIF4G se hidrolizó i) antes de la fase temprana de la infección o ii) antes de la fase tardía de la infección. En ambos casos la síntesis de proteínas y la integridad de eIF4G se determinaron a las 8 hpi. Cuando PV 2A^{pro} se expresó antes de la infección con VV, la síntesis de proteínas virales se inhibió fuertemente con independencia de la dosis de IRES-2A utilizada (Figura 24A). Curiosamente, la incorporación de [³⁵S]-Met/Cys en proteínas celulares fue prácticamente nula en las células electroporadas con 1 µg de IRES-2A, a pesar de que esta dosis sólo afecta ligeramente a la síntesis de proteínas celulares (Figura 24A, carril 2 y Figura 10, carril 2).

Este resultado indica que VV es capaz de producir el “*shut-off*” (silenciamiento) de la traducción aunque la progresión de la infección y, con ello la síntesis de proteínas de VV, es inhibida fuertemente por el corte de eIF4GI. Por otro lado, la electroporación con 1 µg de IRES-2A a las 4 hpi también produjo una fuerte inhibición, aunque no tan extrema como en el caso anterior, de las proteínas tardías de virus (Figura 24D, carril 2). Por lo tanto, la hidrólisis de eIF4GI afecta en mayor medida a la traducción de los mRNAs de VV que a los celulares (Figura 24B y D, carril 2 y Figura 10). Como ocurre en las células no infectadas (Figura 10), la síntesis de proteínas virales se inhibió totalmente con 9 µg de IRES-2A. Estos resultados sugieren que la traducción del mRNA de VV es extremadamente dependiente de eIF4F, especialmente en la fase temprana de la infección viral.

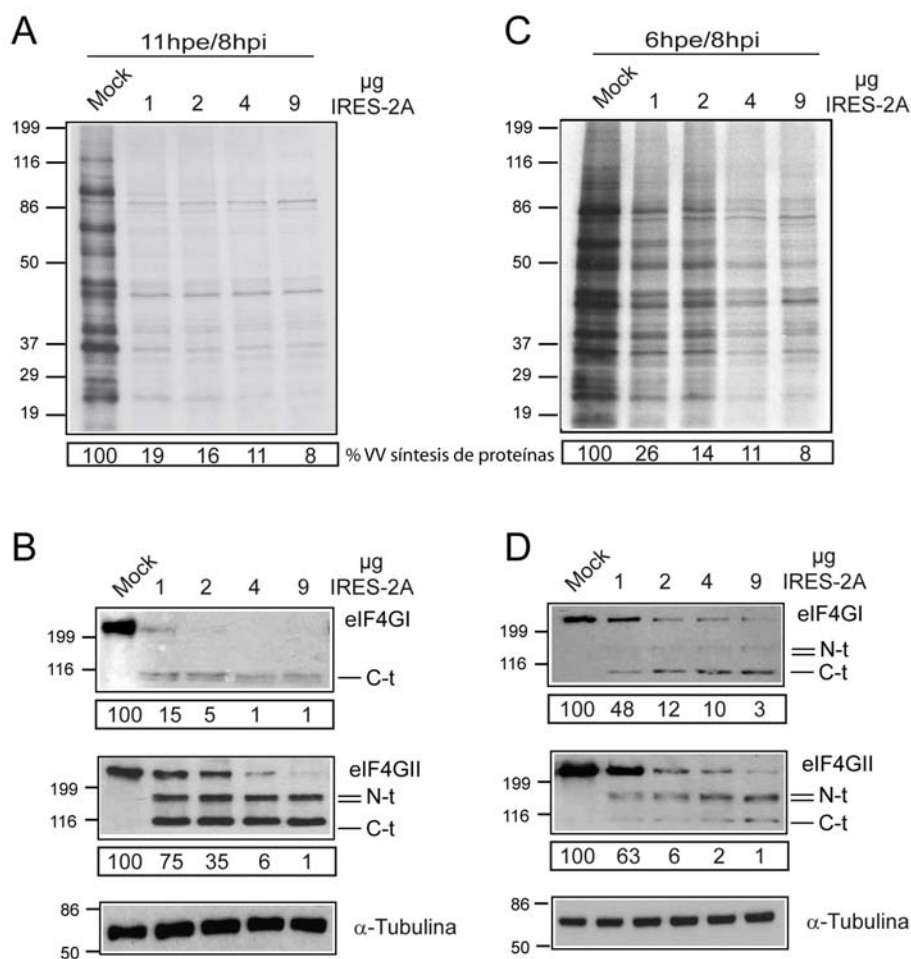


Figura 24. Síntesis de proteínas de VV después del procesamiento proteolítico de eIF4G. Las células HeLa se electroporaron con 1, 2, 4, ó 9 μg de IRES-2A o con tampón de transcripción como control y 2 horas antes (A y B) o después (C y D) infectadas con 10 pfu/célula de VV. Las proteínas se marcaron con [³⁵S] Met/Cys de 7 a 8 hpi y posteriormente las células fueron lisadas. (A y C) la síntesis de proteínas de VV analizada por fluorografía y autoradiografía. (B y D) eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel central), y α-tubulina (panel inferior) fueron examinados por Western blot (10 o 6 hpe).

4.1.4.2 Supresión funcional de los factores de iniciación de la familia 4G: efecto en la síntesis de proteínas del VV

Posteriormente, se estudió la síntesis de proteínas de VV en las células silenciadas con siRNAs contra eIF4G. El silenciamiento individual de eIF4GI o eIF4GII no afectó a la síntesis de proteínas de VV (Figura 25A, B, carriles 8, 9, 12 y 13 y C). Este efecto está en contra de los resultados obtenidos en la figura 24, pero pueden ser explicados por el hecho de que PV 2A^{pro} hidrolizó completamente eIF4G, mientras que una pequeña población de eIF4G resistió al silenciamiento con siRNAs. Sin embargo, la traducción del mRNA de VV fue potentemente inhibida cuando ambas formas de eIF4G, I y II, fueron silenciadas simultáneamente en las células HeLa (Figura 25B, carriles 10 y 14). Por lo tanto, estos resultados indican que eIF4G es esencial para iniciar la traducción de mRNA de VV, como ocurre en el caso de los mRNAs

celulares y de acuerdo con los resultados presentados por Walsh y colaboradores (Walsh et al., 2008).

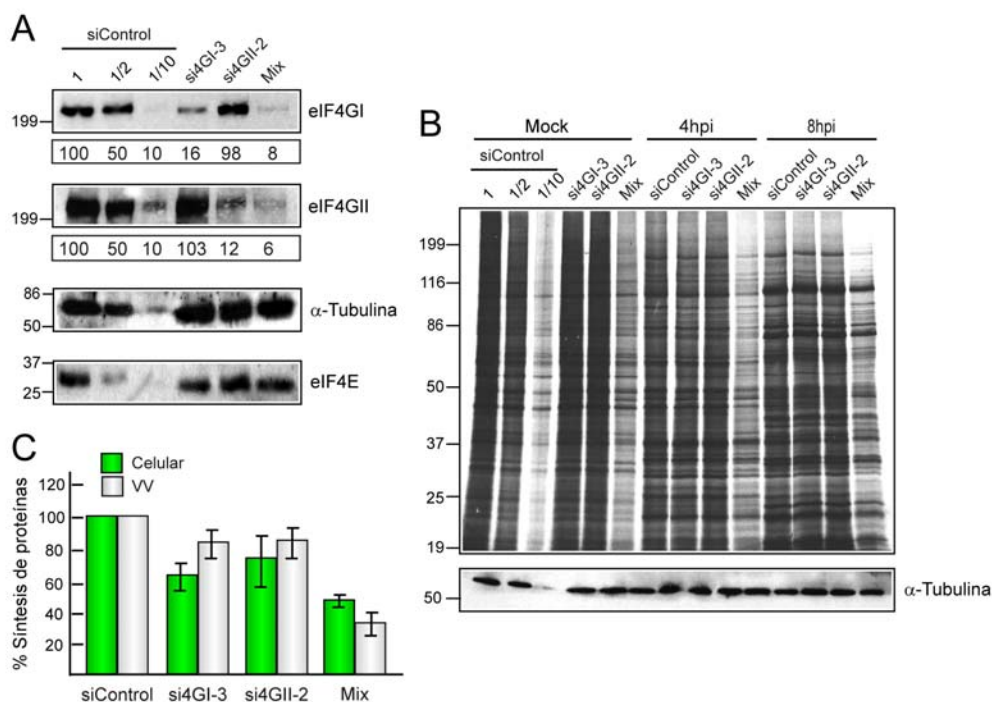


Figura 25. Síntesis de proteínas de VV en células HeLa en ausencia de eIF4GI y eIF4GII. Las células HeLa fueron transfectadas con si4GI-3, si4GII-2, una mezcla de ambos (relación 1:1) o siControl. Se realizaron dos transfecciones con 24 horas de diferencia. A las 48 hpt las células se infectaron con VV (1 ufp / célula) y, a las 0, 3 y 7 hpi, fueron marcadas por 1 hora con [35S] -Met/Cys y recogidas. A) Western blot de extractos de células transfectadas con anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior) o eIF4GII (segundo panel) y los anticuerpos contra α -tubulina (tercer panel) y eIF4E (panel inferior). B) La síntesis de proteínas fue analizada por fluorografía y autorradiografía de las células infectadas o no con VV en 0, 4 y 8 hpi. α -tubulina fue analizada en paralelo por Western blot (panel inferior). C) Porcentaje de la síntesis de proteínas celulares y de VV de tres experimentos diferentes con si4GI-3, si4GII-2s, o ambos.

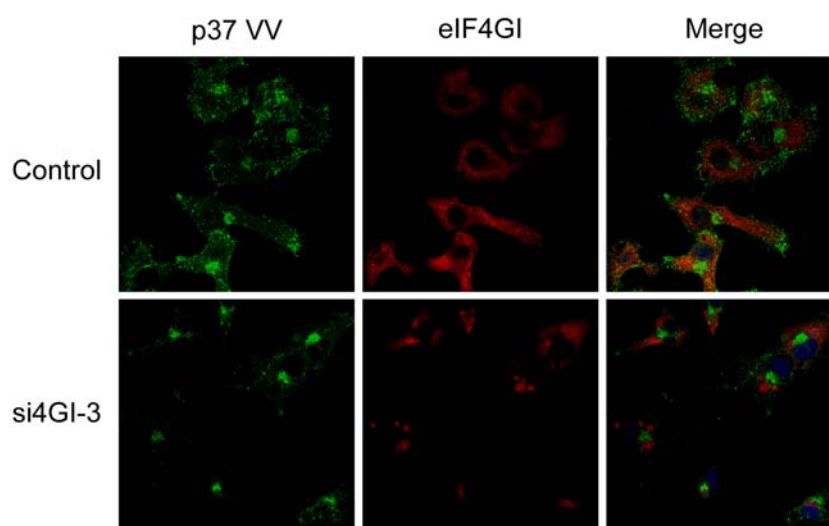


Figura 26. Microscopia confocal de la proteína p37 de VV en células HeLa en la ausencia de eIF4GI. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y eIF4GI fue silenciado de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Las células fueron infectadas con 10 ufp / célula de VV y a las 8 hpi, fijadas, permeabilizadas y procesadas para microscopia de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a la proteína p37 de VV y eIF4GI.

4.2 Papel de eIF2 α en la síntesis de proteínas del virus de la encefalomiocarditis.

4.2.1 Supresión funcional de eIF2 α por silenciamiento: Efecto en la expresión de las proteínas de EMCV

En este caso, las células se transfectaron con una mezcla de cuatro siRNAs diseñados contra eIF2 α . A las 36 horas después de la transfección, las células HeLa fueron infectadas con EMCV y los extractos celulares se obtuvieron a distintos tiempos después de la infección. Mediante este protocolo, los niveles de eIF2 α se redujeron en un 90% (Figura 27) y, en consecuencia, la síntesis de proteínas celulares disminuyó en un 72% (Figura 27).

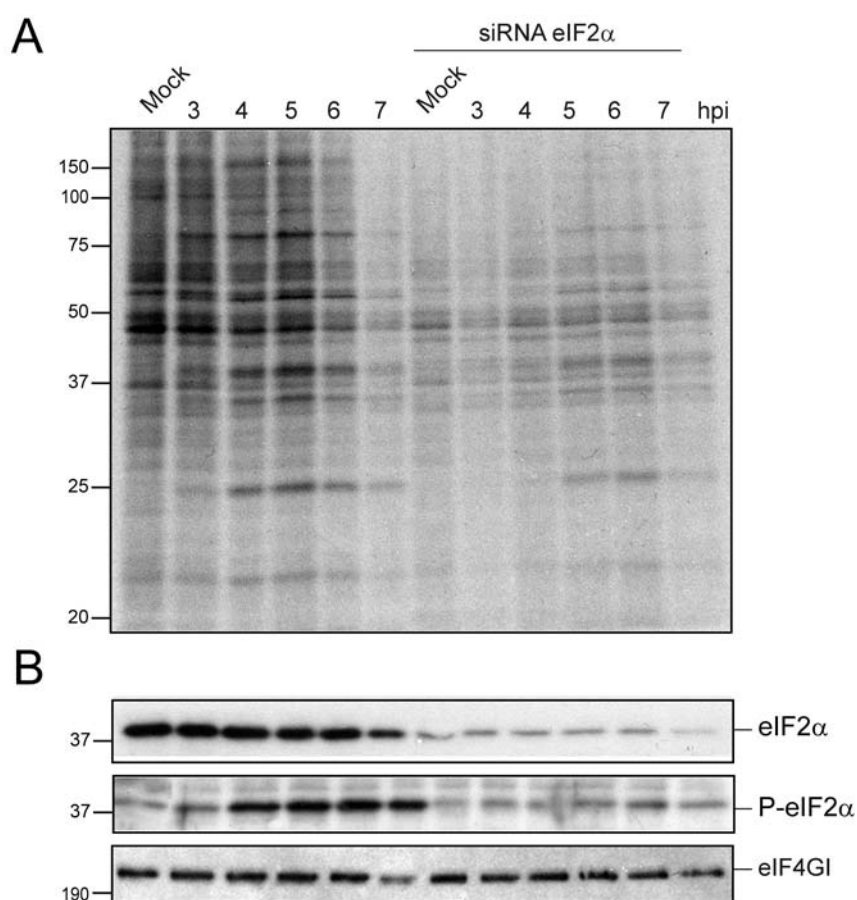


Figura 27. La infección con EMCV de las células HeLa depletadas o no de eIF2 α . A) Células HeLa transfectadas con una mezcla de siRNAs dirigidos frente a eIF2 α mRNA fueron infectadas o no con EMCV (10 ufp / célula) a las 36 horas después de la transfección. La síntesis de proteínas de las células infectadas se determinó por el marcaje metabólico usando [35S] Met-Cys en los tiempos indicados. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE, fluorografía y autorradiografía. B) Western blot de las muestras utilizando anticuerpos frente a eIF2 α o eIF2 α fosforilado. Como control, la cantidad de eIF4GI en cada muestra se determinó utilizando anticuerpos específicos frente a este factor.

En carencia de eIF2 α , la síntesis de proteínas de EMCV se retrasó 1-2 horas, alcanzando niveles similares a las células control en torno a las 6 y 7 hpi. El retraso en la síntesis de

proteínas de EMCV en relación con los niveles de eIF2 α es consistente con la idea de que este factor participa en la traducción viral principalmente durante la fase temprana de la infección. Sin embargo, el RNA de EMCV puede iniciar la traducción independientemente de eIF2 α en tiempos tardíos de la infección.

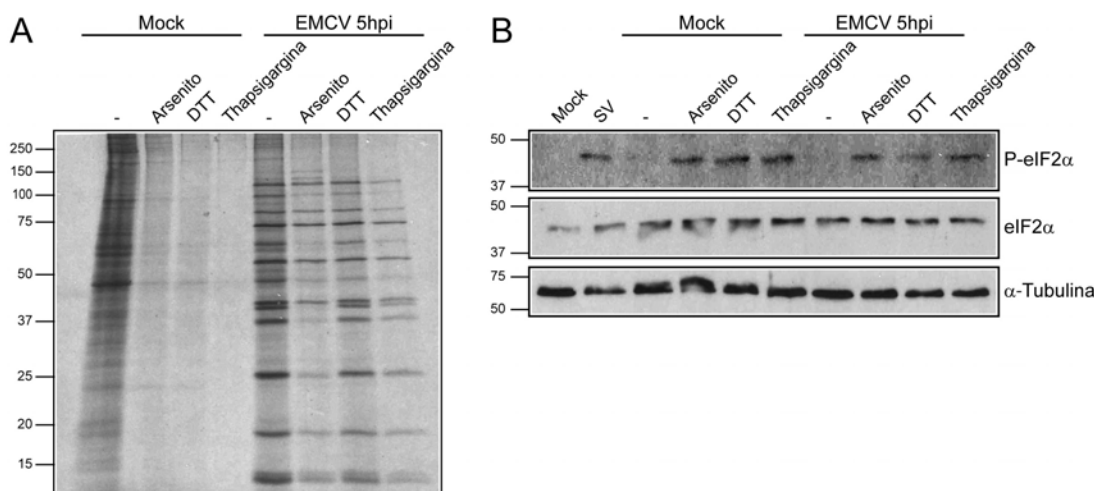


Figura 28. Efecto de diferentes inductores de fosforilación de eIF2 α en la traducción celular y de EMCV. A) Las células MEFs fueron infectados o no con EMCV (10 pfu / célula). Las células fueron posteriormente pre-tratados con 200 μ M de arsenito (Ars), 400 μ M de DTT o 1 μ M de thapsigargina (Tg) durante 15 minutos y luego marcados durante 45 minutos con [35 S] Met-Cys en presencia de los mismos compuestos. Las muestras fueron sometidas a fluorografía y autorradiografía. B) Análisis por Western blot de la cantidad de eIF2 α total y fosforilado.

4.2.2 Inducción de la fosforilación de eIF2 α en la traducción celular de EMCV

Para estudiar en mayor detalle el papel de eIF2 en el ciclo infectivo de EMCV utilizamos ditiotreitolo (DTT), thapsigargina (Tg) o arsenito (Ars); dado que estos compuestos inducen la fosforilación de eIF2 α y, en consecuencia, una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Figura 28).

El tratamiento con 200 μ M de Ars, 400 μ M de DTT o 1 μ M de Tg no tuvo efecto sobre la cantidad total de eIF2 α , mientras que la forma fosforilada de este factor se incrementó substancialmente en las células control en presencia de cualquiera de estos tres compuestos y como consecuencia, la síntesis de proteínas celulares disminuyó fuertemente (Figura 28A y B). Por el contrario, la síntesis de proteínas de EMCV apenas se afectó por el tratamiento con estos agentes; a pesar de la fuerte fosforilación de eIF2 α . El tratamiento de las células no infectadas con DTT indujo una inhibición del 92% en la traducción celular, mientras que la síntesis de proteínas de EMCV sólo disminuyó en un 24% (Figura 28A). Notablemente, la fosforilación de eIF2 α fue evidente en las células infectadas por EMCV desde las 5 hpi, incluso en ausencia de

compuestos. Esto sugiere que la infección por EMCV induce la fosforilación de eIF2 α (Figura 29). Es importante resaltar que el Ars afectó parcialmente a la proteólisis de la poliproteína de EMCV (Figura 28). Dado que el DTT no indujo este efecto, usamos este compuesto en los siguientes experimentos.

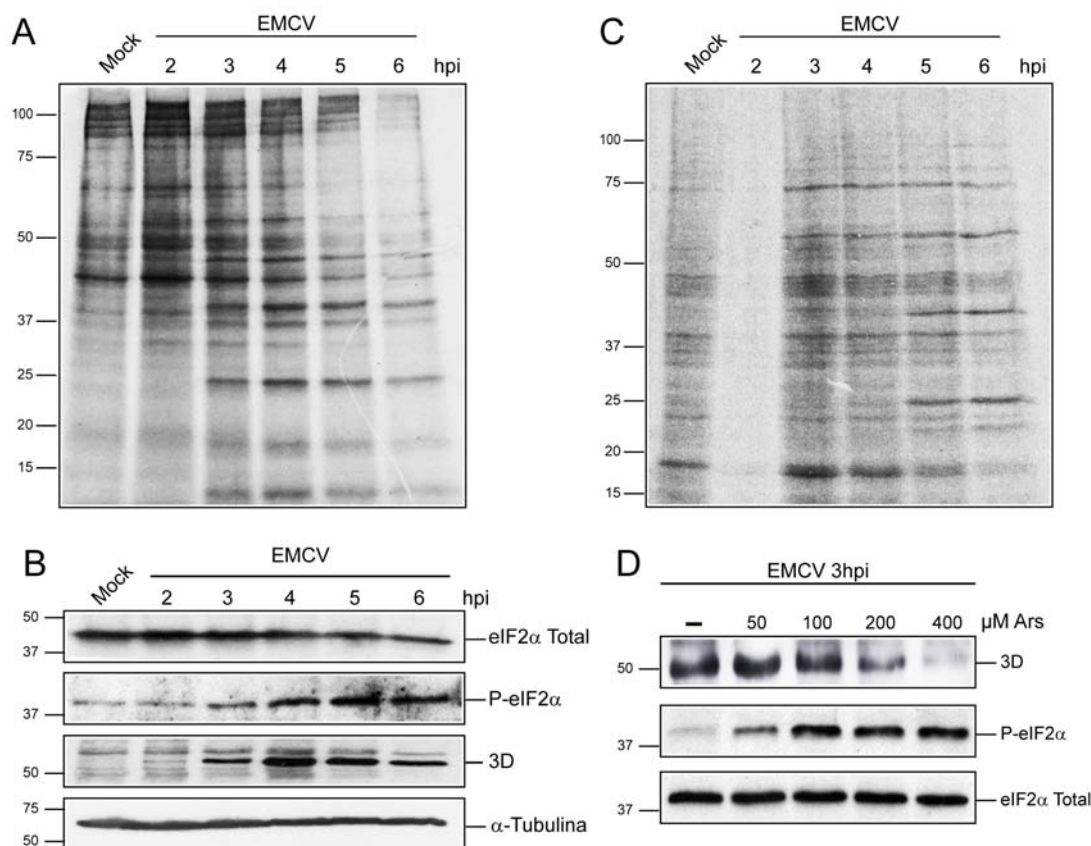


Figura 29. El tratamiento con Ars en tiempos tempranos de la infección con EMCV. Las células MEFs fueron infectadas con EMCV (10 ufp / célula) y, a continuación la síntesis de proteínas se determinó mediante el marcaje con [35S] Met-Cys cada hora desde 1 hasta 6 hpi. B) Las muestras fueron analizadas por Western blot frente a los anticuerpos de las proteínas 3D, eIF2 α - fosforilado, eIF2 α - Total y α - Tubulina. C) MEFs fueron infectadas con EMCV como en el panel A. Luego se trató las células con 200 μ M de Ars durante 1h (0-1 hpi) A continuación, se lavó las células de Ars y se añadió medio fresco. La síntesis de proteínas se analizó en el momento del tratamiento con Ars y cada hora a partir de entonces hasta las 6 hpi. D) Estas muestras también fueron analizadas por Western blot con los anticuerpos frente a 3D, eIF2 α - fosforilado y eIF2 α - total.

Posteriormente se testó el efecto de concentraciones crecientes de DTT (30, 60, 125, 250 y 500 μ M) en la síntesis de proteínas celular y viral (Figura 30A). La síntesis de proteínas celulares se inhibió de manera dependiente de la dosis de DTT siendo total con la dosis más alta del compuesto (Figura 30, panel A, línea 6). En cambio, la síntesis de proteínas de EMCV fue afectada en menor medida siendo detectable incluso con DTT 500 μ M (Figura 30, panel A, línea 12). Estos resultados demuestran que la traducción de EMCV tiene un bajo requerimiento en eIF2 a tiempos tardíos de la infección.

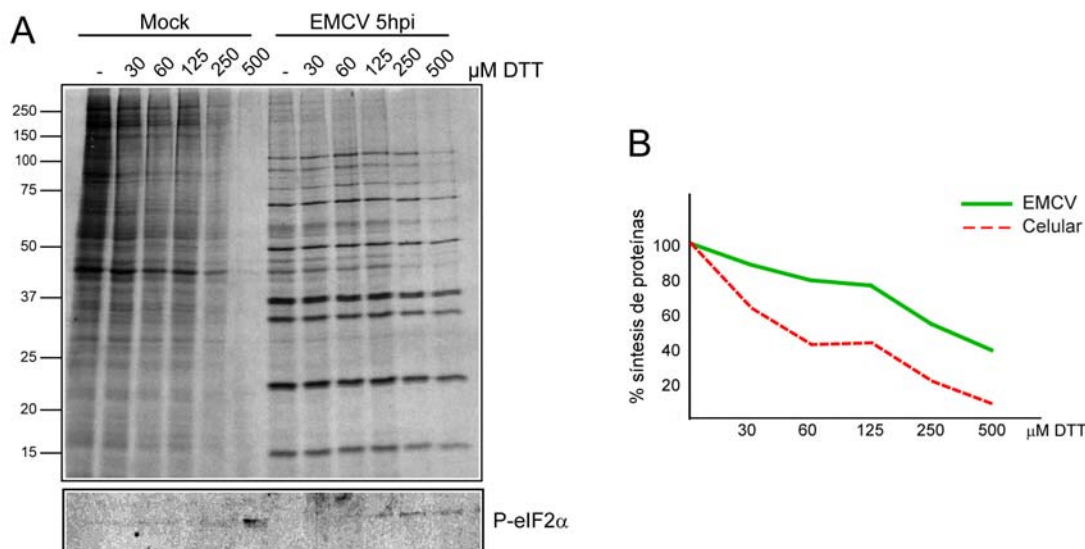


Figura 30. Efecto de la fosforilación de eIF2α por diferentes concentraciones de DTT en la traducción celular y de EMCV. A) Las células MEFs infectadas o no con EMCV (10 pfu / célula) fueron pre-tratadas durante 15 minutos con 0, 30, 60, 125, 250 ó 500 μM de DTT y luego fueron marcadas durante 45 minutos con [35S] Met-Cys en presencia de las mismas cantidades de DTT. Las muestras se recogieron y fueron analizadas por fluorografía y autoradiografía y la cantidad de la forma fosforilada de eIF2α por Western Blot. B) Síntesis de las proteínas celulares y virales se examinó por análisis densitométrico de la autoradiografía.

4.2.3 Distribución de la maquinaria de traducción en las células infectadas por VSV y EMCV

La síntesis de proteínas en las células infectadas por virus normalmente se realiza en focos discretos en el citoplasma que se corresponden con las áreas donde se replica el genoma viral (Katsafanas and Moss, 2007; Sanz et al., 2009). Los ribosomas están presentes en estos focos junto a los eIFs que participan en la traducción, mientras que muchos de los factores celulares que no están involucrados en la síntesis de proteínas, en la replicación viral o en la morfogénesis de los viriones, se excluyen de dichos compartimentos. Para determinar la localización de algunos componentes de la traducción estudiados en esta tesis doctoral en relación con la localización de las factorías virales, se llevaron a cabo análisis por inmunofluorescencia.

4.2.3.1 Localización de los factores de la traducción en células infectadas con VSV.

Primero se llevó a cabo la hibridación in situ (FISH) utilizando oligo d(T)-fluoresceína, seguido por un análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a la proteína ribosómica P y eIF2α (Figura 31A). En las células HeLa no infectadas, tanto los ribosomas como el eIF2α se localizan en el citoplasma, mientras que el oligo d(T) posee una localización en focos de alta

intensidad (speckles) en el núcleo y difusa en el citoplasma. En las células infectadas con VSV, los ribosomas y eIF2 α , que indican los lugares donde la síntesis de proteínas tiene lugar, se acumulan en una región perinuclear, donde se observa la señal del oligo d(T). Utilizando el programa ImageJ con la aplicación “*Just Another Colocalization*” (JaCoP) (Bolte and Cordelières, 2006), se calculó el ratio de la colocalización. Para eIF2 α y ribosomas Coeficiente de Pearson fue 0,93 en la escala de 0 a 1, que indica colocalización casi total entre eIF2 α y ribosomas.

Por otro lado, el eIF4GI se localiza alrededor del núcleo, cerca de los ribosomas. Sin embargo, una inspección más detallada muestra que eIF4GI no coincide exactamente con los lugares ocupados por los ribosomas. De hecho, el valor de colocalización obtenido para el coeficiente de Pearson es de 0,3. Por lo tanto, la coincidencia entre eIF4GI y ribosomas es baja, ya que como se ha demostrado anteriormente, eIF4GI no es esencial para la síntesis de proteínas de VSV.

4.2.3.2 Localización subcelular de eIFs y ribosomas en las células infectadas por EMCV.

eIF2 α colocaliza con la proteína ribosomal P en el citoplasma en las células MEF no infectadas, como se esperaría de componentes pertenecientes a la misma maquinaria celular (traducción). Por el contrario, estas dos proteínas no colocalizan en las células infectadas con EMCV (Figura 32), siendo el Coeficiente de Pearson de 0,96 para las células Mock y 0,28 para las células infectadas. La polimerasa 3D de EMCV, que marca los sitios de replicación viral, se observa en el citoplasma de las células infectadas, especialmente en el área perinuclear. En el caso de eIF2 α y la proteína 3D de EMCV, el coeficiente de Pearson fue de 0,32, lo que sugiere que eIF2 no co-localiza de los sitios de replicación viral. Con el fin de determinar que este efecto es específico para eIF2 y no relativo a la maquinaria de traducción en general se estudió la localización de eIF4G. Este factor de iniciación está presente en el citoplasma alrededor del núcleo (Figura 32), colocalizando perfectamente con la proteína ribosomal P, tanto en las células infectadas (correlación = 0,89) como en las no infectadas (correlación = 0,92). Además, eIF4GI también colocaliza con la proteína 3D de EMCV (correlación = 0,9), lo que sugiere que eIF4G (o al menos, su dominio C-terminal) participa en la traducción de EMCV, tal y como se ha descrito (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006). Por lo tanto, los resultados obtenidos en relación con la localización subcelular de eIF2 α apoyan la idea de que eIF2, a diferencia de eIF4GI, no es esencial en la iniciación de la síntesis de proteínas de EMCV.

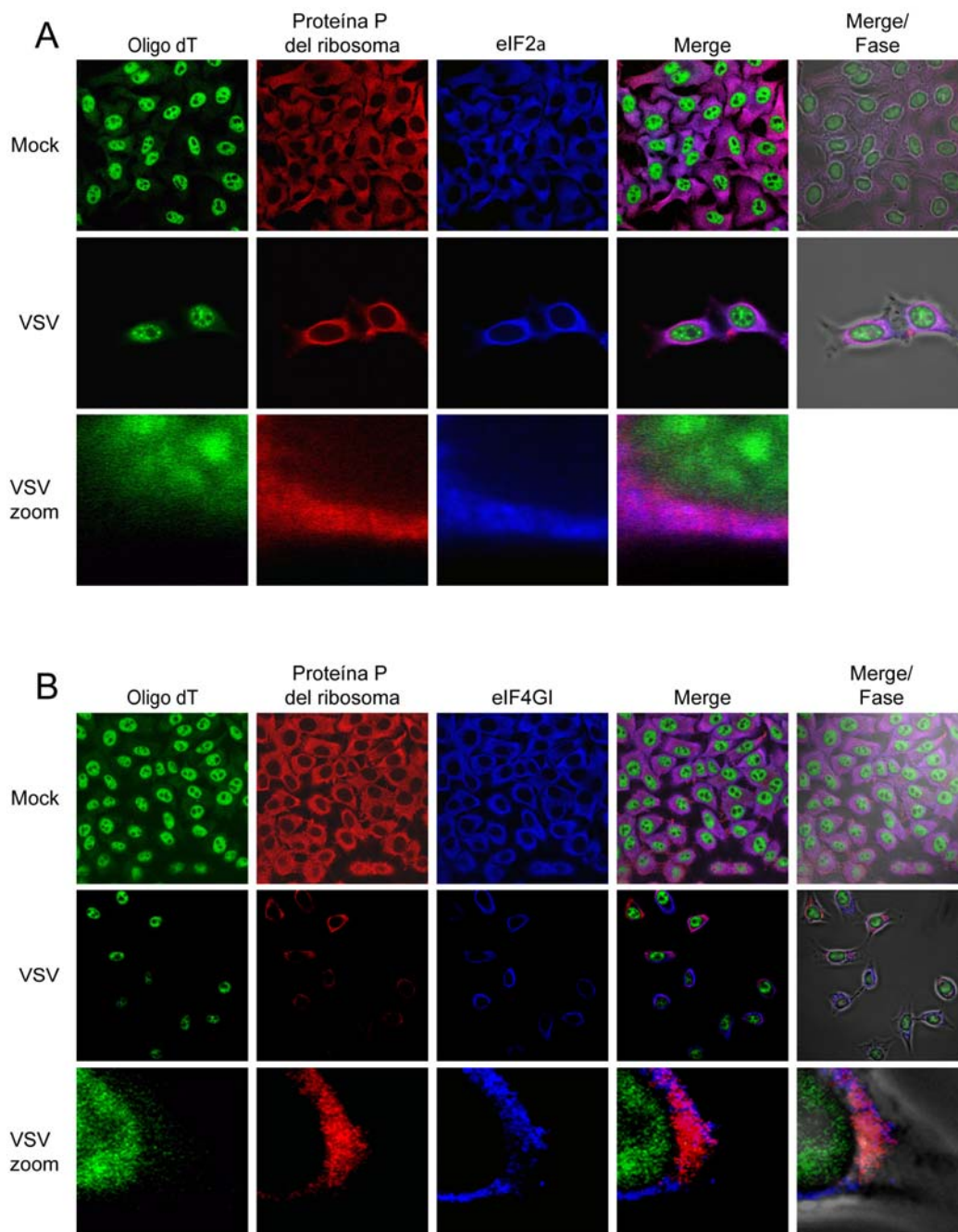


Figura 31. La localización de eIF2α y eIF4GI en células HeLa infectadas con VSV. Las células HeLa fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio e infectadas o no con VSV (10 pfu / célula). A las 7 hpi células fueron permeabilizadas, fijadas y luego se llevó a cabo la hibridación in situ con la sonda oligo d(T) - fluoresceína. La proteína ribosomal P y eIF2α (A) o la proteína P ribosomal y eIF4GI (B) fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron examinadas por microscopía confocal y el contorno celular se define por microscopía de contraste de fase. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Huygens 3.0.

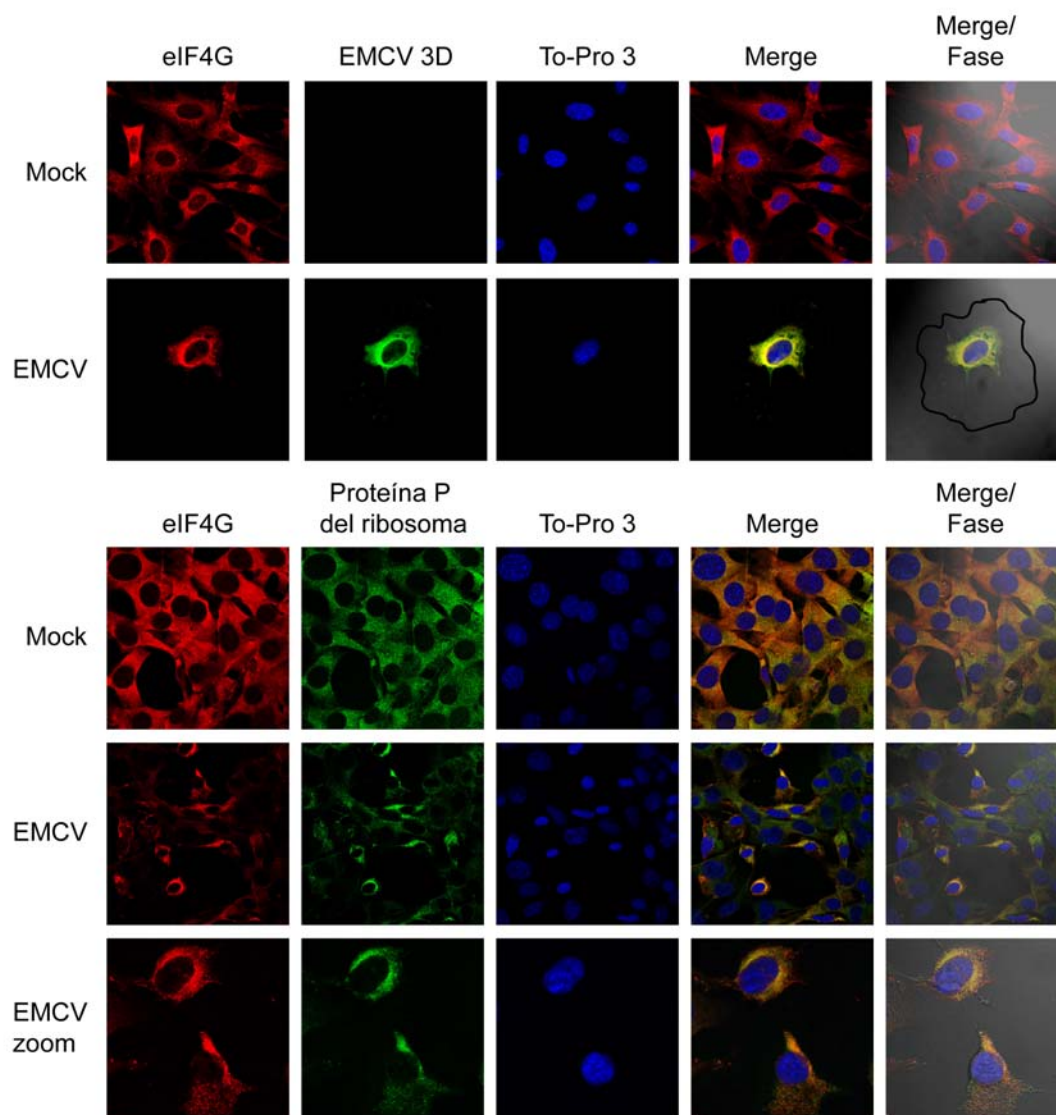


Figura 32. Localización subcelular de eIF2 α , de la proteína ribosomal P y de la proteína 3D de EMCV en las células infectadas o no con EMCV. Las células HeLa fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio e infectadas o no con EMCV (10 ufp / célula). A las 5 hpi, las células fueron fijadas y permeabilizadas. A) eIF2 α y la 3D de EMCV fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta en células infectadas o no con EMCV. ToPro 3 indica la localización del núcleo. B) La localización de la proteína ribosomal P y eIF2 α . El esquema celular se define por la microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) (Nomarski).

Discusión

5.1 Factor eIF4G

Existen dos formas de eIF4G, eIF4GI y eIF4GII, que interactúan con eIF4E y eIF4A para formar el complejo eIF4F, encargado de reconocer la estructura cap del mRNA. Por otro lado, eIF4G interactúa con PABP, unida a la cola de poli(A) del mRNA. Esta doble interacción con los extremos del mRNA conlleva su circularización, conformación favorable para una traducción activa (Castello et al., 2006). Además, eIF4G media el reclutamiento del complejo 43S mediante la interacción con eIF3. Todas estas características hacen que eIF4G sea una pieza importante para coordinar la correcta formación de la maquinaria de iniciación de la traducción en los mRNAs celulares. Teniendo este hecho en cuenta, nuestro primer objetivo fue evaluar la importancia de eIF4G en la traducción de mRNAs virales. Este objetivo fue abordado mediante dos metodologías complementarias de ablación funcional: hidrólisis y silenciamiento. El primer método se basa en la electroporación de un mRNA que codifica la proteasa 2A de poliovirus en células HeLa. Esta proteasa hidroliza específicamente eIF4G de manera dependiente de dosis y tiempo, siendo eIF4GI proteolizado más rápido y eficientemente que eIF4GII. En una segunda aproximación transfectamos RNAs de interferencia (siRNA) en el mismo sistema celular usando lipofectaminas.

La hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII por proteasas virales conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares en cultivo, así como en los sistemas libres de células (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006; Lloyd, 2006). Gracias a nuestro método de expresión de PV 2A^{pro} eIF4GI y eIF4GII se proteolizan diferencialmente, dejando intacta PABP (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006). La hidrólisis de eIF4G por proteasas virales genera productos interferentes con la maquinaria de traducción de la célula (Lloyd, 2006). En particular, el fragmento N-terminal de eIF4G contiene sitios de unión con eIF4E y PABP, los cuales promueven la interacción con el mRNA. Sin embargo, este fragmento N-terminal no puede unirse a eIF3 y, en consecuencia, a la subunidad 40S, ya que el sitio de interacción con eIF3 está situado en la región C-terminal. Por lo tanto, escindiendo eIF4G en dos mitades no solo se inhibe su función, sino que se interferiría con posibles eventos de traducción cap and poly(A)-dependiente. Consecuentemente, la electroporación de una dosis alta de EMC IRES-2A induce una drástica inhibición de la traducción en células HeLa, acompañado con la hidrólisis de ambas formas de eIF4G.. Dado que se requiere un corte total de ambos, eIF4GI y eIF4GII para bloquear la traducción celular, es posible hipotetizar que la inhibición de la función de eIF4G tiene un mayor peso en este evento que la interferencia que potencialmente podrían promover los productos de corte. De hecho, en algunos tipos celulares, el extremo N-terminal de eIF4G es extremadamente inestable, pero la inhibición de la síntesis de proteínas es completa (Castello, Alvarez, and Carrasco, 2006; Castello et al., 2006).

Por otro lado la interferencia simultanea con siRNAs de eIF4GI y eIF4GII en las células en proliferación resulta en una inhibición parcial de la traducción celular (60-40%). Es importante destacar que dicha inhibición incompleta correlaciona con un silenciamiento parcial de dichos factores de iniciación (80-90%). El proceso de transformación celular generalmente conlleva un aumento en los niveles basales y en la actividad de los componentes de eIF4F para promover la síntesis de proteínas (Clemens, 2004; Lin et al., 2008). Teniendo este hecho en cuenta, una disminución de aproximadamente un 85% en los niveles de eIF4G en células HeLa no debería dar lugar a una supresión completa de la actividad de eIF4F. Otro interesante resultado es que, al contrario que la expresión de 2A^{pro}, el silenciamiento selectivo de eIF4GI con siRNAs inhibe equiparablemente la traducción de mRNAs sintetizados de novo y de los pre-existentes en el citoplasma celular. Este hallazgo sugiere que PV 2A^{pro} afecta a otros pasos de la expresión génica previos a la iniciación de la traducción. De hecho, este importante descubrimiento, nos permitió estudiar el papel de 2A^{pro} en la inhibición del transporte núcleo-citoplasma de RNAs. Esta proteasa inhibe la exportación de mRNA hidrolizando otro factor celular, Nup98, que se corta con cinética similar a eIF4GI. De esta forma, poliovirus podría prevenir la salida de mRNAs celulares involucrados en la respuesta antiviral desde etapas tempranas de la infección (Castello et al., 2009a). Por tanto, la iniciación de la traducción de los mRNAs sintetizados de novo no es más sensible que la de los mRNAs pre-existentes. En este sentido, se requiere una hidrólisis o silencimiento casi total de ambos, eIF4GI y eIF4GII, para inhibir la traducción de las dos poblaciones de mRNAs.

Hay varias estructuras de RNAs virales que incrementan su traducibilidad en condiciones en las que la traducción de los mRNA celulares es inoperante. Por ejemplo, los mRNAs de picornavirus no poseen la estructura “cap”, pero contienen largas y muy estructuradas regiones en su extremo 5'UTR llamadas IRES, que promueven el reclutamiento interno de la subunidad ribosómica 40S cuando la traducción cap-dependiente esta inhibida (Martínez-Salas et al., 2008). Por otro lado, la traducción del mRNA subgenómico de alfavirus tiene pocos requisitos en factores de iniciación como eIF4G o eIF2 α en las células infectadas, a pesar de que estos mRNAs no contienen IRES y tienen estructura cap como los mRNAs celulares (Berben-Bloemheuvel et al., 1992; Castello et al., 2006; Ventoso et al., 2006). Sin embargo, un estudio en nuestro laboratorio demostró que la estructura del mRNA no garantiza, por sí misma, la traducción de los mRNAs virales en las condiciones de la infección (Sanz, Castello, and Carrasco, 2007). En este sentido, algunas proteínas virales y celulares podrían estar implicadas en la traducción selectiva de los mRNAs virales mediante la interacción directa con ciertos eIFs (Aragón et al., 2000; Burgui et al., 2007; Daughenbaugh et al., 2003; Daughenbaugh, Wobus, and Hardy, 2006).

En nuestro trabajo, distinguimos dos comportamientos opuestos en relación con la dependencia de eIF4F durante la traducción de mRNAs virales con cap: por un lado VSV y por

otro VV y FLU. La iniciación de la traducción cap y poli (A)-dependiente es precisamente regulada para controlar el rendimiento de la síntesis de proteínas en respuesta a los estímulos extra- o intracelulares (Richter and Sonenberg, 2005). Muchos virus han desarrollado estrategias para controlar este paso crítico y bloquear así la traducción de los mRNAs celulares. Este es el caso de las proteasas de picornavirus descrita previamente (Lloyd, 2006). Alternativamente, otros virus inducen la defosforilación de eIF4E y la hiperfosforilación de 4E-BP para interferir la unión de eIF4G con eIF4E (Cuesta, Xi, and Schneider, 2000; Gingras et al., 1996; Kleijn et al., 1996). Como se muestra en esta tesis doctoral, la iniciación de la traducción de los mRNAs de VSV no requiere un mecanismo canónico dependiente de cap, ya que tiene lugar cuando eIF4E, eIF4GI o eIF4GII son silenciados o cuando eIF4GI y eIF4GII son hidrolizados por PV 2A^{pro}. Esto es consistente con observaciones realizadas en los años ochenta en las que el VSV replicaba y se expresaba en células infectadas por virus de la polio bajo ciertas condiciones (Alonso and Carrasco, 1982). En cambio otros trabajos anteriores muestran que PV 2A^{pro} interfiere de la misma forma en la síntesis de las proteínas celulares y de VSV (Garry, 1988). Esta última observación no es compatible con nuestro trabajo actual y puede explicarse por el hecho de que la sobreexpresión de PV 2A^{pro} conlleva ciertos efectos pleiotropicos, como la inhibición de la replicación viral (Castello et al., 2006). Además, nuestros resultados concuerdan con datos previos que indican que eIF4E se inactiva, mientras que 4E-BP se activa, en las células infectadas con VSV, lo que conduce a la inhibición de la traducción cap-dependiente (Colina et al., 2008; Connor and Lyles, 2002).

Los mRNAs de VSV tienen las regiones 5' UTR cortas (11-49 nt) y carentes de estructura secundaria. La simplicidad en longitud y estructura de estas secuencias líder probablemente disminuye los requisitos de traducción para algunos factores de iniciación como eIF4A. Por otra parte, una proteína viral podría mediar en el acoplamiento de la subunidad ribosómica 40S omitiendo la unión canónica del cap por eIF4E. Como solo los mRNAs sintetizados *de novo* son preferentemente traducidos en las células infectadas con VSV, una proteína del virus que se uniese a los RNA transcritos por su polimerasa podría actuar como un factor de iniciación específico de la traducción viral, sustituyendo a eIF4F (Whitlow, Connor, and Lyles, 2008). Curiosamente, el silenciamiento de eIF4G no afecta a la síntesis de proteínas de VSV y de hecho, eIF4G no co-localiza con los ribosomas en las células infectadas en contraste con lo observado para eIF2 α . Estos datos sugieren que, el reclutamiento de los mRNAs de VSV a la maquinaria de traducción podría estar mediado exclusivamente por eIF3 con la colaboración de proteínas virales actuando como factores de iniciación virales. De hecho, la proteína M del virus de la rabia (pero no de VSV) interacciona con la subunidad eIF3h impidiendo la iniciación de la traducción (Komarova et al., 2007). El caso más interesante es la proteína N de hantavirus, que puede reemplazar por sí sola la función de eIF4F para la traducción de los mRNAs virales (Mir and Panganiban, 2008). Por lo tanto, se puede especular que el mecanismo por el cual los

mRNAs del VSV reclutan a la maquinaria de síntesis de proteínas podría ser similar a la descrita para el hantavirus.

Se ha publicado que los mRNAs de VV pueden dirigir la síntesis de proteínas en condiciones en las que eIF4G está cortado, pero estos resultados son altamente controvertidos (Aldabe et al., 1995a; Barco, Feduchi, and Carrasco, 2000; Mulder et al., 1998). Nosotros postulamos que la traducción del mRNA de VV depende de eIF4F tal y como recientemente han propuesto otros laboratorios (Katsafanas and Moss, 2007; Walsh and Mohr, 2006). La carencia de eIF4GI en las células HeLa reduce por sí sola la acumulación de p37, mientras que la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII inhibe fuertemente la síntesis global de proteínas de VV. Aunque la expresión de 2A^{pro} es baja en nuestro sistema (sobre todo con 1 µg de IRES-2A, que produce sólo el corte de eIF4GI), no podemos descartar la posibilidad de que 2A^{pro} afecte otras funciones del ciclo viral de VV. Analizando los datos de la hidrólisis y el silenciamiento de eIF4G, podemos formular la hipótesis de que este factor celular es esencial para la síntesis de proteínas de VV. Nuestros resultados son consistentes con una publicación reciente describiendo la acumulación de eIF4E y eIF4G en las factorías de VV. Además de este hecho, eIF4E y 4E-BP son hiperfosforilados en las células infectadas con VV, dando lugar a un aumento en el ensamblaje de eIF4F. Simultáneamente, este complejo es reclutado al entorno de las factorías virales, donde se encuentra el mRNA viral (Katsafanas and Moss, 2007; Walsh et al., 2008). Por otra parte, los mRNAs celulares no pueden competir por la maquinaria de traducción activada, no solo porque es redirigida a los sitios de replicación y transcripción viral, sino porque el virus codifica dos enzimas con actividad de *decapping* que posiblemente desencadenan la degradación de los mRNAs celulares (Parrish and Moss, 2007; Parrish, Resch, and Moss, 2007). Se han observado similares efectos en las células infectadas con herpes simplex virus o el virus de la fiebre porcina africana (Castello et al., 2009b; Feng, Everly, and Read, 2005). Por lo tanto, podemos diferenciar dos estrategias contrapuestas desarrolladas por virus que producen mRNAs con cap para asegurar la síntesis de proteínas virales, inhibiendo al mismo tiempo la producción de las celulares. El primero consiste en la desactivación de uno o más factores de iniciación, mientras que la estructura o la ausencia de estructura del mRNA viral o bien un eIF codificado por virus, promueve la traducción viral. Esto ocurre en células infectadas con picornavirus, hantavirus, rhabdovirus o calicivirus. Por otro lado, los virus DNA complejos, como los poxvirus, aumentan la actividad de eIF4F, pero lo que limita su función a la entorno del virus y activa simultáneamente la degradación de los mRNAs celulares.

5.2 Implicación de eIF2α en la traducción viral

Por otro lado hemos analizado cómo afecta la fosforilación de eIF2α a las células sanas e infectadas con virus. Una de las respuestas antivirales de la célula implica la activación de la

quinasa dependiente del RNA (PKR), que fosforila la subunidad α de eIF2. Esta fosforilación bloquea el intercambio de GDP a GTP, inhibiendo la síntesis de proteínas celulares y virales. Muchos virus han desarrollado estrategias para inhibir la activación de PKR o su capacidad de inactivar el reciclaje de eIF2-GTP. Además, durante la infección con numerosos virus se produce una inhibición del tránsito vesicular entre el RE y el aparato de Golgi, dando lugar a una situación de estrés por la acumulación de proteínas en el RE. Esto conlleva la activación de PERK.

La participación de eIF2 en la formación del complejo ternario Met-tRNA_i-eIF2-GTP es un evento crucial en la iniciación de la traducción de la mayoría de los mRNAs de origen celular o viral (Pestova, 2007; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Sin embargo, la traducción de los mRNAs de algunos virus, como el HCV o CrPV IGR (Intergenic Region), no requiere de la actividad de este factor (Deniz et al., 2009; Lancaster, Jan, and Sarnow, 2006; Terenin et al., 2008; Wilson et al., 2000a). Por otra parte, algunos mRNAs celulares que disponen de elementos IRES pueden ser traducidos en condiciones en las que eIF2 α está fosforilado (Fernandez et al., 2002; Gerlitz, Jagus, and Elroy-Stein, 2002). En esta tesis doctoral se ha analizado el efecto de diferentes inductores de la fosforilación de eIF2. Nuestros resultados actuales indican que la traducción del RNA de picornavirus tiene lugar cuando eIF2 α es fosforilado, lo que revela que este factor no es necesario para traducir el RNA en los tiempos tardíos de la infección. Este es un dato asombroso, ya que dogmáticamente se ha considerado hasta ahora al IRES de poliovirus como dependiente de eIF2. Por tanto, el funcionamiento de los elementos IRES del HCV, IGR de CRPV y picornavirus podrían compartir más características funcionales de lo que se pensaba en un principio (Fernandez et al., 2002; Gerlitz, Jagus, and Elroy-Stein, 2002). Por otra parte, algunos mRNAs celulares que tienen elementos IRES también se pueden traducir cuando eIF2 α es fosforilado (Garrey et al.).

En relación con la traducción eIF2 independiente del RNA de EMCV podemos proponer varias posibilidades. Una o varias proteínas celulares podrían actuar como un sustituto de eIF2 en las condiciones propiciadas por la infección. Esto sería en el caso de la traducción del RNA de HCV, donde eIF5B actúa como un sustituto de eIF2 (Terenin et al., 2008). Alternativamente se ha propuesto recientemente que otras proteínas celulares tales como ligatina, MCT-1 o DENR (density-regulated protein) podrían reemplazar a eIF2 durante la iniciación de la síntesis de proteínas del HCV (Skabkin et al.). Sin embargo, la ligatina no puede reemplazar a eIF2 durante el inicio de la traducción del RNA de EMCV. El papel de la ligatina ha sido destacado considerando a este factor como eIF2D (Dmitriev et al.). De hecho, eIF2D puede reemplazar a eIF2 también en la traducción de algunos mRNAs celulares. La unión del aminoacil tRNA al sitio P del ribosoma es promovido por eIF2D de manera independiente de GTP (Dmitriev et al.). Otra posibilidad es que el IRES se una directamente a la subunidad 40S, o incluso al ribosoma 80S, en el sitio P en la fase tardía de la infección, promoviendo directamente la fase de

elongación. Si esto fuera así, la actividad del IRES de picornavirus podría ser más similar mecanísticamente hablando al IRES IGR de CrPV (Deniz et al., 2009; Pestova, Lomakin, and Hellen, 2004). Por lo tanto, para saber exactamente qué mecanismo tiene lugar durante el inicio de la traducción de los mRNAs virales, este debe ser estudiado en las células infectadas por el virus en cuestión. Los resultados obtenidos en los sistemas libres de células, o incluso en las células transfectadas con estos mRNAs pueden no ser fisiológicos y, muy probablemente, no extrapolables a la situación real por la que dichos mRNAs se traducen en el contexto de la infección.

5.3 eIF4F y eIF2 definen mecanismos duales de iniciación de la traducción en virus.

Se conocen dos mecanismos principales para la iniciación de la traducción en las células eucariotas: cap-dependiente o cap-independiente (Pestova, 2007; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Esta división se basa principalmente en la presencia o no de una estructura cap en el extremo 5' del mRNA y/o los requerimientos para eIF4E durante la traducción del mRNA. Sin embargo, esta clasificación algo simplista puede llevar a cierta confusión, porque hay mRNAs con la estructura cap que no requieren eIF4E. En algunos casos, como adenovirus, virus de la gripe o hantavirus, una proteína viral reconoce la estructura cap del mRNA viral y reemplaza a eIF4E o incluso a eIF4F (Burgui et al., 2007; Mir and Panganiban, 2008; Xi, Cuesta, and Schneider, 2004). Por lo tanto, la traducción depende de la presencia del “cap”, pero eIF4E es dispensable. Este es también el caso del mRNA sg-SV, que no requiere la presencia de eIF4G intacto, pero aún necesita la estructura cap en el extremo 5' de este mRNA (Castello et al., 2006; Sanz et al.). Al definir el mecanismo de iniciación parece más adecuado analizar eIFs que están involucrados en la traducción. Dependiendo de la participación de eIF2 en la traducción, se definen dos mecanismos diferentes de inicio. Uno de ellos es el mecanismo canónico que utiliza complejo ternario Met-tRNA_i-eIF2-GTP, mientras que el otro no requiere este factor. En este último caso una gran variedad de mecanismos pueden ser operativos en función del tipo de mRNA y las condiciones analizadas.

El concepto de que la estructura del mRNA determina por sí misma el mecanismo por el cual el dicho mRNA se traduce ha sido rebatida por los recientes resultados que demuestran que el mRNA subgenómico de virus Sindbis (mRNA sg-SV) exhibe un modo dual de iniciación de la traducción (Sanz et al., 2009). Este mRNA requiere eIF2 activo y el complejo eIF4F intacto cuando se traduce en sistemas libres de células o en células en cultivo. Sin embargo, el mRNA sg-SV dirige eficazmente la traducción en la presencia de eIF2 α fosforilado o eIF4G hidrolizado cuando este mRNA es producido por la maquinaria de

replicación del virus en células infectadas (Sanz et al., 2009). Nuestros resultados actuales apoyan la idea de que los RNAs de picornavirus también presentan un modo dual para su traducción. Por ejemplo, el RNA de EMCV es traducido de manera eficiente a tiempos tardíos de la infección cuando eIF2 α está fosforilado. Por el contrario, como se muestra en este y otros trabajos, la síntesis *in vitro* de proteínas a partir del IRES de EMCV es completamente inhibida por la fosforilación de eIF2 α (Shimoike et al., 2009; Wilson et al., 2000a). Una situación similar se puede observar cuando el RNA que contiene este IRES es transfectado en células o en la fase temprana de la infección por EMCV. Nuestra conclusión es que el RNA del EMCV puede ser traducido por un mecanismo dependiente de eIF2 en la fase inicial de la infección. Con el progreso de la infección, el ambiente celular en sí mismo, o probablemente la acumulación de proteínas virales, promueven que el mismo RNA pueda traducirse cuando eIF2 es inactivado. Por lo tanto, el RNA de EMCV poseería un modo dual de traducción, a pesar de que este RNA posee la misma estructura a tiempos tempranos y tardíos de la infección. Por tanto, el mecanismo por el cual el RNA de picornavirus se traduce dependería de dos parámetros: 1) su estructura (IRES) y 2) el entorno en el que su traducción tiene lugar. Estos resultados explicarían por qué el EMCV puede desencadenar una infección productiva en células que expresan PKR (Meurs et al., 1992).

La dualidad traduccional explicada aquí para los mRNAs virales es observada no sólo con el mRNA sg-SV y el de picornavirus, sino también con mRNA de CrPV. El genoma RNA de dicistrovirus posee dos IRES distintos que dirigen la traducción de las proteínas ORF1 no estructurales y ORF2 estructurales (Garrey et al.). Estos resultados indican que CrPV 5'UTR e IGR IRES son resistentes a las alteraciones en la maquinaria de traducción que son similares a las que se producen durante la infección con CrPV. En concreto, impidiendo la formación de eIF4F expresando 4E-BP en RRL se estimula la traducción de estos IRES. Según este grupo de investigación, los resultados obtenidos correlacionan con que eIF4E y eIF4G se disocian durante la infección por CrPV y proporcionan un modelo por el cual se induce la traducción dirigida por el IRES viral cuando hay shut-off de la traducción celular. Nuestra hipótesis es que las proteínas virales sintetizadas durante la infección son responsables de la transición entre estos dos modos de iniciar la traducción (Sanz et al., 2009). La hidrólisis de eIF4G bloquea el reconocimiento de la estructura “cap” necesaria para la traducción del SV sg-mRNA en las células no infectadas. Sorprendentemente, el complejo eIF4F y por lo tanto el reconocimiento del “cap” no parece estar operativo en las células infectadas por SV durante la síntesis de las proteínas virales tardías. Un efecto parecido se observa en el caso de eIF2 α . Este factor no es necesario para la traducción del SV sg-mRNA porque es altamente fosforilado en las células infectadas. Sin embargo, en las células no infectadas o en sistemas *in vitro*, la fosforilación de eIF2 inducida por el tratamiento con arsenito o poli I:C, bloquea fuertemente la síntesis de proteínas dirigida por SV sg-mRNA. Un RNA viral, como el de SV sg-mRNA, sigue el

mecanismo canónico para la iniciación de la traducción en las células no infectadas o en sistemas libres de células, mientras que el mismo mRNA requiere eIFs diferentes en las células infectadas. Por lo tanto, algunos mRNAs virales pueden presentar un doble mecanismo para su traducción, es decir, los requisitos para eIFs observados en sistemas libres de células pueden ser diferentes de los que se observan en las células infectadas. En las células infectadas por SV sólo los mRNAs sintetizados por la maquinaria de transcripción viral son traducidos en la fase tardía, mientras que los mRNAs electroporados, con la misma estructura, son ignorados por el aparato de traducción (40). En este sentido, la proteína N de hantavirus es capaz de sustituir el complejo eIF4F, actuando como un eIF viral (Mir and Panganiban, 2008; Sanz et al.). La iniciación de la traducción mediada por la proteína N es una estrategia viral complementaria a la utilización de un IRES. A pesar de que el IRES es un elemento en *cis* que suplanta funcionalmente el requisito para la traducción cap-dependiente, N es un elemento *trans* que reemplaza eIF4F (42).

Por tanto, la situación es que, dependiendo del mRNA (celular o viral) y el tipo de sistema utilizado (in vitro, las células intactas, situaciones de estrés, infecciones virales, etc) los requisitos para eIFs pueden variar. Esta imagen puede ser un poco más complicada si tenemos en cuenta que un determinado mRNA puede presentar diferentes mecanismos de iniciación, lo que refleja la plasticidad de algunos RNAs cuando están en situaciones de estrés.

Conclusiones

1. Silenciamiento selectivo de eIF4GI con siRNAs inhibe equiparablemente la traducción de los mRNAs sintetizados de novo y de los pre-existentes en el citoplasma celular. Esta manifestación sugiere que PV 2A^{pro} afecta a otros pasos de la expresión génica previos a la iniciación de la traducción.
2. La iniciación de la traducción de los mRNAs de VSV no requiere un mecanismo canónico dependiente de cap, ya que tiene lugar cuando eIF4E, eIF4GI o eIF4GII son silenciados o cuando eIF4GI y eIF4GII son hidrolizados por PV 2A^{pro}.
3. Silenciamiento de eIF4G no afecta a la síntesis de proteínas de VSV y de hecho, eIF4G no co-localiza con los ribosomas en las células infectadas lo que sugiere que, el reclutamiento de los mRNAs de VSV a la maquinaria de traducción podría estar mediado exclusivamente por eIF3 con la colaboración de proteínas virales actuando como factores de iniciación virales
4. Uno de los requisitos importantes para la infección por virus de la gripe es la presencia de eIF4G. Aunque FLU y VSV son virus RNA de polaridad negativa, sus requerimientos traduccionales difieren
5. eIF4G es esencial para la síntesis de proteínas de VV ya que junto con eIF4E se acumulan en las factorías de VV. Además eIF4E y 4E-BP son hiperfosforilados en las células infectadas con VV, dando lugar a un aumento en el ensamblaje de eIF4F.
6. El RNA de EMCV es traducido de manera eficiente a tiempos tardíos de la infección cuando eIF2 α esta fosforilado. Por el contrario, la síntesis *in vitro* de proteínas a partir del IRES de EMCV es completamente inhibida por la fosforilacion de eIF2 α
7. RNA del EMCV puede ser traducido por un mecanismo dependiente de eIF2 en la fase inicial de la infección. Con el progreso de la infección, el ambiente celular en sí mismo, o probablemente la acumulación de proteínas virales, promueven que el mismo RNA pueda traducirse cuando eIF2 es inactivado.

Bibliografía

- Acker, M. G., and Lorsch, J. R. (2008). Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 4), 653-7.
- Alain, T., Lun, X., Martineau, Y., Sean, P., Pulendran, B., Petroulakis, E., Zemp, F. J., Lemay, C. G., Roy, D., Bell, J. C., Thomas, G., Kozma, S. C., Forsyth, P. A., Costa-Mattioli, M., and Sonenberg, N. Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type I IFN production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4), 1576-81.
- Aldabe, R. (1995). Universidad Autonoma de Madrid, Madrid.
- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I., and Carrasco, L. (1995a). Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem Biophys Res Commun* **215**(3), 928-36.
- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I., and Carrasco, L. (1995b). Expression of poliovirus 2Apro in mammalian cells: effects on translation. *FEBS Lett* **377**(1), 1-5.
- Alonso, M. A., and Carrasco, L. (1982). Translation of capped viral mRNAs in poliovirus-infected HeLa cells. *EMBO J* **1**(8), 913-7.
- Alvarez, E. (2004). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., Gorospe, M., and Nebreda, A. R. (2003). Negative feedback regulation of MKK6 mRNA stability by p38alpha mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**(1), 370-81.
- Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L., and Baltimore, D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* **12**(9), 3587-98.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., and Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**(17), 6259-68.
- Barco, A., Feduchi, E., and Carrasco, L. (2000). A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A(pro): effects on cellular and viral gene expression. *J Virol* **74**(5), 2383-92.
- Barr, J. N., Whelan, S. P., and Wertz, G. W. (2002). Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochim Biophys Acta* **1577**(2), 337-53.
- Belsham GJ, J. D. (2000). "Translation initiation on picornavirus RNA. In Translational Control of Gene Expression Cold Spring Harbor, NY." Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M., and Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**(1), 272-80.
- Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* **60**(3), 499-511.
- Berben-Bloemheugel, G., Kasperaitis, M. A., van Heugten, H., Thomas, A. A., van Steeg, H., and Voorma, H. O. (1992). Interaction of initiation factors with the cap structure of chimaeric mRNA containing the 5'-untranslated regions of Semliki Forest virus RNA is related to translational efficiency. *Eur J Biochem* **208**(3), 581-7.
- Bernstein, H. D., Sonenberg, N., and Baltimore, D. (1985). Poliovirus mutant that does not selectively inhibit host cell protein synthesis. *Mol Cell Biol* **5**(11), 2913-23.
- Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E. (1982). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**(15), 4803-12.

- Bolte, S., and Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**(Pt 3), 213-32.
- Bommer, U. A., Lutsch, G., Stahl, J., and Bielka, H. (1991). Eukaryotic initiation factors eIF-2 and eIF-3: interactions, structure and localization in ribosomal initiation complexes. *Biochimie* **73**(7-8), 1007-19.
- Browning, K. S., Webster, C., Roberts, J. K., and Ravel, J. M. (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* **267**(14), 10096-100.
- Burda, J., Martin, M. E., Gottlieb, M., Chavko, M., Marsala, J., Alcazar, A., Pavon, M., Fando, J. L., and Salinas, M. (1998). The intraschemic and early reperfusion changes of protein synthesis in the rat brain. eIF-2 alpha kinase activity and role of initiation factors eIF-2 alpha and eIF-4E. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(1), 59-66.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., and Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**(Pt 12), 3263-74.
- Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N., and Nieto, A. (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* **81**(22), 12427-38.
- Carrasco, L., Almendral del Rio, J.M. (2006a). "Virus Patogenos." I ed. (E. Feduchi, Irurzun, A., Ed.) Editorial Helice, Madrid.
- Carrasco, L. a. A. J. M. (2006b). "Virus patogenos." Fundacion BBVA, Madrid.
- Castello, A. (2008). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Castello, A. (2009). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Castello, A., Alvarez, E., and Carrasco, L. (2006). Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* **281**(44), 33206-16.
- Castello, A., Izquierdo, J. M., Welnowska, E., and Carrasco, L. (2009a). RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *J Cell Sci* **122**(Pt 20), 3799-809.
- Castello, A., Quintas, A., Sanchez, E. G., Sabina, P., Nogal, M., Carrasco, L., and Revilla, Y. (2009b). Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog* **5**(8), e1000562.
- Castello, A., Sanz, M. A., Molina, S., and Carrasco, L. (2006). Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* **355**(5), 942-56.
- Castrillo, J. L. (1986). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Chen, J. J. (2007). Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* **109**(7), 2693-9.
- Clemens, M. J. (2004). Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* **23**(18), 3180-8.
- Clemens, M. J., Bushell, M., and Morley, S. J. (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* **17**(22), 2921-31.
- Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J. M., Strudwick, S., and Borden, K. L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* **20**(16), 4547-59.
- Coldwell, M. J., and Morley, S. J. (2006). Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol Cell Biol* **26**(22), 8448-60.

- Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R. J., Jaramillo, M., Tai, L. H., Breitbach, C. J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y. V., Makrigiannis, A. P., Bell, J. C., and Sonenberg, N. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* **452**(7185), 323-8.
- Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* **76**(20), 10177-87.
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., Krnjevic, K., Lacaille, J. C., Nader, K., and Sonenberg, N. (2007). eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **129**(1), 195-206.
- Costa-Mattioli, M., and Sonenberg, N. (2006). Translational control of long-term synaptic plasticity and memory storage by eIF2alpha. *Crit Rev Neurobiol* **18**(1-2), 187-95.
- Craig, A. W., Haghighat, A., Yu, A. T., and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**(6675), 520-3.
- Cuesta, R., Laroya, G., and Schneider, R. J. (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev* **14**(12), 1460-70.
- Cuesta, R., Xi, Q., and Schneider, R. J. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J* **19**(13), 3465-74.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., and Borden, K. L. (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* **6**(1), 65-9.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W., and Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* **22**(11), 2852-9.
- Daughenbaugh, K. F., Wobus, C. E., and Hardy, M. E. (2006). VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Viol J* **3**, 33.
- De Benedetti, A., and Baglioni, C. (1986). Activation of hemin-regulated initiation factor-2 kinase in heat-shocked HeLa cells. *J Biol Chem* **261**(1), 338-42.
- Deniz, N., Lenarcic, E. M., Landry, D. M., and Thompson, S. R. (2009). Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA* **15**(5), 932-46.
- Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**(4), 545-56.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240), 914-8.
- Diez, J., Davila, M., Escarmis, C., Mateu, M. G., Dominguez, J., Perez, J. J., Giralt, E., Melero, J. A., and Domingo, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* **64**(11), 5519-28.
- Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Andreev, D. E., Ivanov, P. A., Dunaevsky, J. E., Merrick, W. C., and Shatsky, I. N. GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* **285**(35), 26779-87.

- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A., and Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* **19**(12), 3142-56.
- Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* **262**(1), 380-8.
- Elton, D., Amorim, M. J., Medcalf, L., and Digard, P. (2005). 'Genome gating'; polarized intranuclear trafficking of influenza virus RNPs. *Biol Lett* **1**(2), 113-7.
- Fata-Hartley, C. L., and Palmenberg, A. C. (2005). Dipyridamole reversibly inhibits mengovirus RNA replication. *J Virol* **79**(17), 11062-70.
- Feigenblum, D., and Schneider, R. J. (1993). Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* **67**(6), 3027-35.
- Feng, P., Everly, D. N., Jr., and Read, G. S. (2005). mRNA decay during herpes simplex virus (HSV) infections: protein-protein interactions involving the HSV virion host shutoff protein and translation factors eIF4H and eIF4A. *J Virol* **79**(15), 9651-64.
- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D., and Hatzoglou, M. (2002). Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem* **277**(21), 19198-205.
- Foeger, N., Glaser, W., and Skern, T. (2002). Recognition of eukaryotic initiation factor 4G isoforms by picornaviral proteinases. *J Biol Chem* **277**(46), 44300-9.
- Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M. W., Mattaj, I. W., and Sachs, A. B. (2000). The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol Cell* **6**(1), 191-6.
- Garcia, M. A., Meurs, E. F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**(6-7), 799-811.
- Garrey, J. L., Lee, Y. Y., Au, H. H., Bushell, M., and Jan, E. Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J Virol* **84**(2), 1124-38.
- Garry, R. F. (1988). Poliovirus protease 2A is required for interference with vesicular stomatitis virus-specified protein synthesis. *Arch Virol* **103**(1-2), 133-7.
- Gebauer, F., and Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10), 827-35.
- Gerlitz, G., Jagus, R., and Elroy-Stein, O. (2002). Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* **269**(11), 2810-9.
- Gil, J., Alcami, J., and Esteban, M. (1999). Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* **19**(7), 4653-63.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63.
- Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11), 5578-83.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12), 5547-51.

- Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., Skern, T., and Belsham, G. J. (2004). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *J Virol* **78**(7), 3271-8.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S., and Sonenberg, N. (1998a). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**(1), 334-42.
- Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H., and Sonenberg, N. (1998b). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11089-94.
- Grifo, J. A., Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J., and Merrick, W. C. (1983). New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem* **258**(9), 5804-10.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). "Antibodies. A laboratory manual." N.Y. Cold Spring Harbor Press, Ed., N.Y.
- Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**(13), 1593-612.
- Her, L. S., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (1997). Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* **276**(5320), 1845-8.
- Hernandez, G., and Vazquez-Pianzola, P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* **122**(7-8), 865-76.
- Hershey, J. W. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **60**, 717-55.
- Hinnenbusch, A. G. (2000). "Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In Translational Control." (J. W. B. H. M. B. M. N. Sonenberg, Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY:
- Hundsdoerfer, P., Thoma, C., and Hentze, M. W. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38), 13421-6.
- Hunt, D. M. (2010). "Virus Replication, In: Microbiology and Immunology On-line." (R. C. Hunt, Ed.) University of South Carolina School of Medicine.
- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**(24), 7480-9.
- Imataka, H., Olsen, H. S., and Sonenberg, N. (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J* **16**(4), 817-25.
- Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* **17**(12), 6940-7.
- Ito, T., Jagus, R., and May, W. S. (1994). Interleukin 3 stimulates protein synthesis by regulating double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16), 7455-9.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2), 113-27.

- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., and Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* **5**, 48.
- Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**, 657-704.
- Katsafanas, G. C., and Moss, B. (2007). Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* **2**(4), 221-8.
- Kaufman, R. J., Davies, M. V., Pathak, V. K., and Hershey, J. W. (1989). The phosphorylation state of eucaryotic initiation factor 2 alters translational efficiency of specific mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**(3), 946-58.
- Kimball, S. R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1), 25-9.
- Kimball, S. R. (2001). Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Prog Mol Subcell Biol* **26**, 155-84.
- Kirchweger, R., Ziegler, E., Lamphear, B. J., Waters, D., Liebig, H. D., Sommergruber, W., Sobrino, F., Hohenadl, C., Blaas, D., Rhoads, R. E., and et al. (1994). Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* **68**(9), 5677-84.
- Kleijn, M., Vrans, C. L., Voorma, H. O., and Thomas, A. A. (1996). Phosphorylation state of the cap-binding protein eIF4E during viral infection. *Virology* **217**(2), 486-94.
- Komarova, A. V., Real, E., Borman, A. M., Brocard, M., England, P., Tordo, N., Hershey, J. W., Kean, K. M., and Jacob, Y. (2007). Rabies virus matrix protein interplay with eIF3, new insights into rabies virus pathogenesis. *Nucleic Acids Res* **35**(5), 1522-32.
- Krishnamoorthy, J., Mounir, Z., Raven, J. F., and Koromilas, A. E. (2008). The eIF2alpha kinases inhibit vesicular stomatitis virus replication independently of eIF2alpha phosphorylation. *Cell Cycle* **7**(15), 2346-51.
- Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L., and Latham, A. G. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**(2), 181-9.
- Lai, H. K., and Borden, K. L. (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* **19**(13), 1623-34.
- Laitusis, A. L., Brostrom, M. A., and Brostrom, C. O. (1999). The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. *J Biol Chem* **274**(1), 486-93.
- Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**(37), 21975-83.
- Lamphear, B. J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H. D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Cocksackievirus and rhinovirus. *J Biol Chem* **268**(26), 19200-3.
- Lancaster, A. M., Jan, E., and Sarnow, P. (2006). Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* **12**(5), 894-902.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., and Gallie, D. R. (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-

- 4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* **272**(26), 16247-55.
- Levy-Strumpf, N., Deiss, L. P., Berissi, H., and Kimchi, A. (1997). DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Mol Cell Biol* **17**(3), 1615-25.
- Lewis, S. M., Cerquozzi, S., Graber, T. E., Ungureanu, N. H., Andrews, M., and Holcik, M. (2008). The eIF4G homolog DAP5/p97 supports the translation of select mRNAs during endoplasmic reticulum stress. *Nucleic Acids Res* **36**(1), 168-78.
- Liang, L., Diehl-Jones, W., and Lasko, P. (1994). Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* **120**(5), 1201-11.
- Lin, C. J., Cencic, R., Mills, J. R., Robert, F., and Pelletier, J. (2008). c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer Res* **68**(13), 5326-34.
- Lloyd, R. E. (2006). Translational control by viral proteinases. *Virus Res* **119**(1), 76-88.
- Lorsch, J. R., and Herschlag, D. (1998). The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide. *Biochemistry* **37**(8), 2180-93.
- Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M., and Palese, P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**(6), 2861-7.
- Lyles, D. S. (2000). Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4), 709-24.
- Madan, M. V. (2005). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**(9), 4990-7.
- Marintchev, A., and Wagner, G. (2004). Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* **37**(3-4), 197-284.
- Marissen, W. E., and Lloyd, R. E. (1998). Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol Cell Biol* **18**(12), 7565-74.
- Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R., and Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**(8), 755-63.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., and Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**(Pt 3), 611-26.
- Matts, R. L., Schatz, J. R., Hurst, R., and Kagen, R. (1991). Toxic heavy metal ions activate the heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 alpha kinase by inhibiting the capacity of hemin-supplemented reticulocyte lysates to reduce disulfide bonds. *J Biol Chem* **266**(19), 12695-702.
- McKendrick, L., Thompson, E., Ferreira, J., Morley, S. J., and Lewis, J. D. (2001). Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* **21**(11), 3632-41.
- Merrick, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* **56**(2), 291-315.

- Metz, A. M., Timmer, R. T., and Browning, K. S. (1992). Isolation and sequence of a cDNA encoding the cap binding protein of wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4F. *Nucleic Acids Res* **20**(15), 4096.
- Meurs, E. F., Watanabe, Y., Kadereit, S., Barber, G. N., Katze, M. G., Chong, K., Williams, B. R., and Hovanessian, A. G. (1992). Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J Virol* **66**(10), 5805-14.
- Mir, M. A., and Panganiban, A. T. (2008). A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* **27**(23), 3129-39.
- Moerke, N. J., Aktas, H., Chen, H., Cantel, S., Reibarkh, M. Y., Fahmy, A., Gross, J. D., Degterev, A., Yuan, J., Chorev, M., Halperin, J. A., and Wagner, G. (2007). Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* **128**(2), 257-67.
- Montero, H., Rojas, M., Arias, C. F., and Lopez, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J Virol* **82**(3), 1496-504.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V., and Sonenberg, N. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* **20**(2), 468-77.
- Morley, S. J., and Naegele, S. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *J Biol Chem* **277**(36), 32855-9.
- Morley, S. J., and Naegele, S. (2003). Phosphorylation of initiation factor 4E is resistant to SB203580 in cells expressing a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38. *Cell Signal* **15**(8), 741-9.
- Mulder, J., Robertson, M. E., Seamons, R. A., and Belsham, G. J. (1998). Vaccinia virus protein synthesis has a low requirement for the intact translation initiation factor eIF4F, the cap-binding complex, within infected cells. *J Virol* **72**(11), 8813-9.
- Novella, I. S. (2003). Contributions of vesicular stomatitis virus to the understanding of RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol* **6**(4), 399-405.
- Novoa, I. (1996). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Novoa, I., and Carrasco, L. (1999). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Mol Cell Biol* **19**(4), 2445-54.
- Parrish, S., and Moss, B. (2007). Characterization of a second vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J Virol* **81**(23), 12973-8.
- Parrish, S., Resch, W., and Moss, B. (2007). Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7), 2139-44.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**(6180), 320-5.
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7029-36.

- Pestova, T. V., Lomakin, I. B., and Hellen, C. U. (2004). Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* **5**(9), 906-13.
- Pestova, T. V. H., C.U. (2007). "The mechanism of translation initiation in eukaryotes." Translational Control in Biology and Medicine (M. M. N. JH, Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **17**(19), 5811-21.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R. M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**(3), 847-58.
- Preiss, T., and M, W. H. (2003). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* **25**(12), 1201-11.
- Prevot, D., Darlix, J. L., and Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* **95**(3-4), 141-56.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C. H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J. L., and Ohlmann, T. (2003). Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4G1 critical for ribosomal scanning. *EMBO J* **22**(8), 1909-21.
- Prostko, C. R., Brostrom, M. A., Malara, E. M., and Brostrom, C. O. (1992). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78. *J Biol Chem* **267**(24), 16751-4.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* **18**(1), 270-9.
- Raghunathan, P. L., and Guthrie, C. (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol* **8**(15), 847-55.
- Rau, M., Ohlmann, T., Morley, S. J., and Pain, V. M. (1996). A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **271**(15), 8983-90.
- Raught, B., and Gingras, A. C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1), 43-57.
- Raven, J. F., and Koromilas, A. E. (2008). PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* **7**(9), 1146-50.
- Rhoads, R. E. (2009). eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* **284**(25), 16711-5.
- Richter, J. D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**(7025), 477-80.
- Rodriguez, P. L. (1994). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Rom, E., Kim, H. C., Gingras, A. C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (1998). Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J Biol Chem* **273**(21), 13104-9.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7), 519-29.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3), 1065-70.

- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* **10**(3), 1134-44.
- Rychlik, W., Russ, M. A., and Rhoads, R. E. (1987). Phosphorylation site of eukaryotic initiation factor 4E. *J Biol Chem* **262**(22), 10434-7.
- Sadler, A. J., Latchoumanin, O., Hawkes, D., Mak, J., and Williams, B. R. (2009). An antiviral response directed by PKR phosphorylation of the RNA helicase A. *PLoS Pathog* **5**(2), e1000311.
- Salvatore, M., Basler, C. F., Parisien, J. P., Horvath, C. M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (2002). Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **76**(3), 1206-12.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**(4), 778-809, table of contents.
- Sanz, M. A., Castello, A., and Carrasco, L. (2007). Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* **81**(13), 7061-8.
- Sanz, M. A., Castello, A., Ventoso, I., Berlanga, J. J., and Carrasco, L. (2009). Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells. *PLoS One* **4**(3), e4772.
- Sanz, M. A., Welnowska, E., Redondo, N., and Carrasco, L. Translation driven by picornavirus IRES is hampered from Sindbis virus replicons: rescue by poliovirus 2A protease. *J Mol Biol* **402**(1), 101-17.
- Schmitt, E., Naveau, M., and Mechulam, Y. Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Lett* **584**(2), 405-12.
- Schneider, R. J., and Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **28**(3), 130-6.
- Scorsone, K. A., Panniers, R., Rowlands, A. G., and Henshaw, E. C. (1987). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 during physiological stresses which affect protein synthesis. *J Biol Chem* **262**(30), 14538-43.
- Seipelt, J., Guarne, A., Bergmann, E., James, M., Sommergruber, W., Fita, I., and Skern, T. (1999). The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res* **62**(2), 159-68.
- Shimoike, T., McKenna, S. A., Lindhout, D. A., and Puglisi, J. D. (2009). Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA. *Antiviral Res* **83**(3), 228-37.
- Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev* **24**(16), 1787-801.
- Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1), 56-63.
- Sonenberg, N., and Gingras, A. C. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **10**(2), 268-75.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**(4), 731-45.
- Sonenberg, N., Morgan, M. A., Testa, D., Colonna, R. J., and Shatkin, A. J. (1979). Interaction of a limited set of proteins with different mRNAs and protection of 5'-caps against pyrophosphatase digestion in initiation complexes. *Nucleic Acids Res* **7**(1), 15-29.

- Spriggs, K. A., Bushell, M., Mitchell, S. A., and Willis, A. E. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-transacting factors. *Cell Death Differ* **12**(6), 585-91.
- Strudwick, S., and Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* **70**(1), 10-22.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S. E., Kaufman, R. J., and Ramaiah, K. V. (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* **39**(42), 12929-38.
- Suragani, R. N., Ghosh, S., Ehtesham, N. Z., and Ramaiah, K. V. (2006). Expression and purification of the subunits of human translational initiation factor 2 (eIF2): phosphorylation of eIF2 alpha and beta. *Protein Expr Purif* **47**(1), 225-33.
- Svitkin, Y. V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* **25**(23), 10556-65.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001). Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *Rna* **7**(12), 1743-52.
- Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1997). Binding of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) to eIF4G represses translation of uncapped mRNA. *Mol Cell Biol* **17**(12), 6876-86.
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(8), 836-41.
- Todaro, G. J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**, 299-313.
- Topisirovic, I., Capili, A. D., and Borden, K. L. (2002). Gamma interferon and cadmium treatments modulate eukaryotic initiation factor 4E-dependent mRNA transport of cyclin D1 in a PML-dependent manner. *Mol Cell Biol* **22**(17), 6183-98.
- Ulmanen, I., Broni, B. A., and Krug, R. M. (1981). Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7355-9.
- Ventoso, I., Sanz, M. A., Molina, S., Berlanga, J. J., Carrasco, L., and Esteban, M. (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* **20**(1), 87-100.
- Vilela, C., Velasco, C., Ptushkina, M., and McCarthy, J. E. (2000). The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J* **19**(16), 4372-82.
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., and McCarthy, J. E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* **11**(6), 503-11.
- Wagner, J. D., Jankowsky, E., Company, M., Pyle, A. M., and Abelson, J. N. (1998). The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J* **17**(10), 2926-37.

- Walsh, D. Manipulation of the host translation initiation complex eIF4F by DNA viruses. *Biochem Soc Trans* **38**(6), 1511-6.
- Walsh, D., Arias, C., Perez, C., Halladin, D., Escandon, M., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., and Mohr, I. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol Cell Biol* **28**(8), 2648-58.
- Walsh, D., and Mohr, I. (2006). Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes Dev* **20**(4), 461-72.
- Wang, Y., Wagner, J. D., and Guthrie, C. (1998). The DEAH-box splicing factor Prp16 unwinds RNA duplexes in vitro. *Curr Biol* **8**(8), 441-51.
- Wek, R. C., Jiang, H. Y., and Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1), 7-11.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**(1), 135-40.
- Whitlow, Z. W., Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2006). Preferential translation of vesicular stomatitis virus mRNAs is conferred by transcription from the viral genome. *J Virol* **80**(23), 11733-42.
- Whitlow, Z. W., Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2008). New mRNAs are preferentially translated during vesicular stomatitis virus infection. *J Virol* **82**(5), 2286-94.
- Williams, B. R. (2001). Signal integration via PKR. *Sci STKE* **2001**(89), re2.
- Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2000a). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**(4), 511-20.
- Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., and Sarnow, P. (2000b). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* **20**(14), 4990-9.
- Witherell, G. W., and Wimmer, E. (1994). Encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site RNA-protein interactions. *J Virol* **68**(5), 3183-92.
- Xi, Q., Cuesta, R., and Schneider, R. J. (2004). Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev* **18**(16), 1997-2009.
- Yamanaka, S., Poksay, K. S., Arnold, K. S., and Innerarity, T. L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev* **11**(3), 321-33.
- Yanguéz, E., Castello, A., Welnowska, E., Carrasco, L., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2011). Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. *Virology* **413**(1), 93-102.
- Yoffe, Y., Zuberek, J., Lewdorowicz, M., Zeira, Z., Keasar, C., Orr-Dahan, I., Jankowska-Anyszka, M., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Shapira, M. (2004). Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA* **10**(11), 1764-75.
- Yuan, H., Puckett, S., and Lyles, D. S. (2001). Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J Virol* **75**(9), 4453-8.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., Fodor, E., Rao, Z., and Liu, Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240), 909-13.